

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**FACTORES DE VIRULENCIA DE *E. coli* O104: H4:  
ACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES**

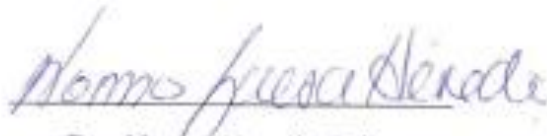
**POR**

**M.C. YARAYMI ORTIZ REYES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**JULIO 2020**

FACTORES DE VIRULENCIA DE *E. coli* O104: H4:  
ACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES  
COMITÉ DE TESIS



Dra. Norma Heredia Rojas  
DIRECTORA DE TESIS



Dr. Eduardo Franco Frias  
SECRETARIO



Dr. José Santos García Alvarado  
VOCAL 1



Dr. José Ángel Merino Mascorro  
VOCAL 2



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto  
VOCAL 3

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Norma Heredia Rojas y la co-dirección del Dr. José Santos García Alvarado. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto 582121).

## DEDICATORIA

*A Dios y a la Virgen de la Caridad del Cobre “Patrona de todos los cubanos” por darme la fuerza suficiente para enfrentar esta etapa de tantos cambios en mi vida. Gracias por haber puesto en mi camino personas que además de apoyarme en mis sueños, me enseñaron que debemos enfrentar el futuro con amor y que por más oscura que parezca la noche, siempre va a amanecer.*

## AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor agradezco:

A mis hijos *Yuli* y *Dundy* por inspirarme a ser valiente y seguir adelante cada día con el corazón lleno de **amor**.

A mis padres *Julio* y *Yara* por apoyarme de manera **incondicional** toda mi vida.

A alguien que ha sido como un segundo papá, *pipa* gracias por velar por mis niños.

A mi madrina *Tere*, por tenerme presente en sus **oraciones**.

A mi *hermano* Tito, mi hermana de la vida *Eugenia Carolina*, y mi tío *Callillo*, por el cariño que me han demostrado siempre.

A *mis familiares y amigos* en Cuba, que aún con la distancia me siguen demostrando su **afecto**.

A la *Dra. Norma* y el *Dr. Santos* por darme una hermosa oportunidad en mi vida y enseñarme a amar la investigación... **admiro** su dedicación y les deseo muchos éxitos.

A mis amigos: *Alondra*, *Almita*, *Nere*, *Faby*, *Axel*, *Mares* y *Abel* por hacerme **sonreír** y demostrarme que la amistad verdadera no tiene fronteras.

A los **maestros** del Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos en especial al *Dr. Ángel* por estar en cada paso de la investigación, y a los maestros del Doctorado que día a día formaron mi perfil profesional actual.

A mis compañeras de trabajo en servicio externo *Ely*, *Tere* y *Angy*, muchas gracias por el **cariño** y el **ánimo** que siempre me brindan.

A *Alam García Heredia*, por heredarme la investigación y **contribuir** con demostrado conocimiento al desarrollo de la presente y a su esposa Janeth por ser tan especial conmigo desde el primer día que me conoció.

A los alumnos del laboratorio, de los cuales siempre **aprendo** algún tema.

A la subdirección de posgrado, en especial a la Lic. Mirthala que con tanta **paciencia** ha guiado mi proceso desde que me encontraba en mi país y a CONACYT por el **apoyo** financiero sin el cual hubiese sido imposible cumplir este propósito de mi vida.

A los compañeros de internacionalización que me apoyaron siempre y son un colectivo maravilloso.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de formar una nueva etapa profesional en México.

*A todos muchas gracias...*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	5
4.1. Características generales de <i>E. coli</i> .....	5
4.2. Serotipo <i>E. coli</i> O104:H4. Epidemiología y prevalencia genética. ....	6
4.3. Importancia de la adhesión en los patotipos EHEC y EAEC. ....	7
4.4 Factores de <i>E. coli</i> O104:H4 que promueven la colonización en el hospedero. ....	10
4.5. Toxina Shiga 2a. Factor de virulencia que desencadena la respuesta inmune. ....	11
4.6. Resistencia a antibióticos. Potencial multiresistente de <i>E. coli</i> O104:H4. ....	12
4.7. Impacto de los compuestos naturales en la eficiencia de adhesión de <i>E. coli</i> . ....	14
4.8. Actividad <i>in vitro</i> de compuestos naturales sobre la adhesión de microorganismos. ....	15
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	20
General .....	20
Específicos .....	20
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
8.1. Bacterias y condiciones de cultivo. ....	21
8.2. Antimicrobianos .....	21
8.3. Concentración mínima bactericida (CMB) .....	22
8.4. Línea celular .....	22
8.5. Efecto de los antimicrobianos en la viabilidad de <i>E. coli</i> y las células HEp-2. ....	23
a) Bacteria .....	23
b) Línea celular HEp-2 .....	23

8.6. Efecto de los antimicrobianos en la adhesión de <i>E. coli</i> a las células HEp-2. ....	24
8.9. Análisis de expresión génica. ....	30
8.8 Obtención de mutantes $\Delta aap$ y $\Delta aggA$ por recombinación homóloga. ....	32
8.9. Análisis estadístico. ....	34
<b>9. RESULTADOS</b> .....	36
9.1 Efecto de los antimicrobianos sobre la viabilidad bacteriana. ....	36
9.2. Efecto de los antimicrobianos en la adhesión de <i>E. coli</i> a las células HEp-2. ....	39
a) Los antimicrobianos afectan la capacidad de unión de <i>E. coli</i> y en menor grado de células HEp-2. ....	40
b) Los antimicrobianos afectan la capacidad únicamente de <i>E. coli</i> para unirse las células HEp-2. ....	44
c) Los antimicrobianos actúan solo sobre las células HEp-2. ....	46
d) Los antimicrobianos pueden desprender las bacterias unidas a células HEp-2. ....	47
e) Las bacterias no adheridas expuestas a antimicrobianos pueden mantener memoria de no-adhesión.....	48
9.3. Análisis del patrón de adhesión.....	51
9.4. Análisis de expresión génica. ....	52
a) Bacterias adheridas.....	52
b) Bacterias no adheridas .....	53
9.5. Análisis de expresión de genes. Genes de estrés oxidativo en HEp-2. ....	56
9.6. Obtención de mutantes híbridas. ....	57
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>11. CONCLUSIONES:</b> .....	64
<b>12.REFERENCIAS.</b> .....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

1	Genes y cebadores utilizados para detectar la expresión de genes de virulencia de cepas de <i>E. coli</i> y la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo en células HEp-2 después del ensayo de adhesión.....	31
2	Concentración mínima bactericida (CMB, mg / ml) de antimicrobianos de tres serotipos de <i>E. coli</i> . Los valores entre paréntesis indican las concentraciones sub-CMB utilizadas.....	36
3	pH de medios de cultivo con compuestos antimicrobianos.....	38
4	Estimación del porcentaje de mortalidad de <i>E. coli</i> por medición de la integridad de su membrana.....	39
5	Porcentaje de células de <i>E. coli</i> adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. Las bacterias se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEp-2. Después de 3 h se determinaron las bacterias adheridas a la línea celular. ....	43
6	Porcentaje de células de <i>E. coli</i> adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. Las bacterias crecieron en dos medios diferentes y se agregaron antimicrobianos, después de 1 h los medios se descartaron y las células de <i>E. coli</i> se suspendieron en medio MEM nuevo y se usaron para infectar monocapas de HEp-2. Después de 3 h se determinaron las células de <i>E. coli</i> adheridas.....	45
7	Porcentaje de células de <i>E. coli</i> adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. En este ensayo, monocapas confluentes de células HEp-2 se preincubaron con los antimicrobianos y se incubaron por 1 h: se eliminó el medio y la línea celular fue infectada con <i>E. coli</i> . Después de 3 h se determinaron las células de <i>E. coli</i> adheridas.....	46
8	Capacidad de sub-CMB (mg/ml) de antimicrobianos para separar células de <i>E. coli</i> unidas a HEp-2. Las bacterias infectaron monocapas de HEp-2 durante 1 h, se retiraron las bacterias no adheridas y se añadieron los antimicrobianos por 3 h. Se determinó el porcentaje (%) de bacterias adheridas.....	47
9	Determinación de la memoria de <i>E. coli</i> para inhibir la adhesión a células HEp-2, por bacterias previamente expuestas a antimicrobianos, pero no adheridas a la línea celular. Las bacterias expuestas, pero no adheridas a las células HEp-2, fueron recolectadas y utilizadas para infectar monocapas de células HEp-2 por tres períodos consecutivos. Las células de <i>E. coli</i> adheridas se determinaron por recuento en placa.....	50
10	Número de bacterias y agregados bacterianos por campo en muestras teñidas por Giemsa posterior al ensayo de adhesión a).....	52



11	Sobre-expresión o represión de genes de <i>E. coli</i> relacionados a la adhesión por efecto de exposición a antimicrobianos. Las bacterias se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEp-2. Después de 3 h se midió su expresión.....	55
12	Sobre-expresión o represión de genes de células HEp-2 relacionados con el estrés oxidativo por efecto de exposición a antimicrobianos. Las bacterias se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEp-2. Después de 3 h se realizó la determinación.....	57

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Patotipos de <i>E. coli</i> causante de diarrea. Fuente de la imagen Nataro & Kaper, 1998.....	6
2	Adherencia localizada de células de <i>E. coli</i> sobre células epiteliales HEP-2. Fuente de la imagen Vidal, 2014.....	8
3	Patrón de adherencia agregativa "ladrillo apilado" de <i>E. coli</i> O104: H4 en células epiteliales intestinales HCT-8. Fuente de la imagen Karch <i>et al.</i> , 2012.....	9
4	Características híbridas de <i>E. coli</i> O104:H4 y representación esquemática del origen de sus genes asociados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos (EAEC/STEC). Fuente de la imagen Navarro-García, 2015.....	10
5	Modo de acción de la toxina Shiga. Fuente de la imagen Karch <i>et al.</i> , 2012.....	12
6	Patrón de adhesión de ladrillos apilados de <i>E. coli</i> O104:H4, donde se observa factores de alta virulencia: stx-2; plásmido <i>pAA</i> y resistencia a los antibióticos. Fuente de la imagen (Soon <i>et al.</i> , 2012).....	14
7	Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos, afectan la capacidad de unión de <i>E. coli</i> y en menor grado de células HEP-2.....	26
8	Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos, afectan la capacidad únicamente de <i>E. coli</i> para unirse las células HEP-2.....	27
9	Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos afectan la capacidad de las células HEP-2 para permitir la unión de <i>E. coli</i> .....	28
10	Diseño experimental para determinar si las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos pueden separar a células de <i>E. coli</i> previamente adheridas a células HEP-2.....	29
11	Diseño experimental para determinar si células de <i>E. coli</i> previamente expuestas a antimicrobianos, pero no unidas a células HEP-2 pueden conservar la memoria de inhibición de la adhesión.....	30
12	Esquema del método utilizado para la digestión de pUC57 y pKD46 con enzimas de restricción.....	33
13	Esquema de la preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes.....	34
14	Esquema para la extracción de plásmidos. Fuente de la imagen. Imagen modificada para fines de este estudio.....	34
15	Viabilidad de <i>E. coli</i> 042 Chile en presencia de concentraciones sub-CMB de antimicrobianos (mg/ml).....	37

16	Porcentaje de viabilidad de células HEp-2 realizada después de 4 horas de exposición a sub-CMB de antimicrobianos por el método MTT.....	40
17	Porcentaje de bacterias de <i>E. coli</i> unidas a células HEp-2 después de la pre-incubación de <i>E. coli</i> con antimicrobianos por 1 h. Alícuotas se usaron para infectar células HEp-2, y después de 3 h se determinaron las bacterias adheridas.....	42
18	Porcentaje de células de <i>E. coli</i> adheridas a HEp-2. Las células de <i>E. coli</i> fueron expuestas a antimicrobianos y a la línea celular. Las células que no se adhirieron fueron recolectadas y se pusieron en contacto con nuevas monocapas no tratadas de células HEp-2 y se midió el % de adhesión. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones.....	49
19	Patrón de adhesión por <i>E. coli</i> O104:H4 por efecto de su pre-incubación con antimicrobianos. Las células se lavaron y se tiñeron con Giemsa. (A) Control. Bacterias tratadas con: (B) rifaximina 0.005 mg / ml, (C) carvacrol 0.010 mg / ml y, (D) orégano 0.040 mg / ml.....	51
20	Electroforesis mostrando clonas híbridas post-recombinación homóloga en gel de agarosa al 1.0 %.....	58

---

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
<i>stx</i>	Gen de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
AA	Adherencia agregativa
AL	Adherencia localizada
FAA	Fimbria de adherencia agregativa
pAA	Plásmido de adherencia agregativa
CMB	Concentración Mínima Bactericida
Sub-CMB	Concentración por debajo de la CMB
MH	Müller Hinton
Hb	<i>Haematoxylon brassiletto</i> (palo de brasil)
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle
MEMsup	MEM suplementado
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Del inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa
ml	Mililitro
MDa	Megadalton
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
Il	Interleucina
FKN	Fractalina
pb	Pares de base
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidad formadora de colonia
MTT	Metil tiazol tetrazolio
E/C	Extracto y compuestos
h	hora
min	minuto

## 1. RESUMEN

Es conocido que la adhesión de bacterias a la mucosa intestinal facilita la internalización de microorganismos patógenos y el desarrollo de procesos patológicos en humanos. *E. coli* O104:H4 se considera un serotipo híbrido que comparte factores de virulencia de los patotipos de *E. coli*, del enterohemorrágico (EHEC) y del enteroagregativo (EAEC). El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de los antimicrobianos naturales y sintéticos (carvacrol, extracto de orégano, brasilina, extracto de palo de brasil, y rifaximina) sobre la adhesión de EHEC, EAEC y el serotipo híbrido O104:H4 a las células HEp-2 y la expresión de genes asociados involucrados en este proceso. Se utilizaron dos concentraciones de antimicrobianos, que no afectaron el crecimiento ( $P < 0.05$ ) ni dañaron las células bacterianas. Se realizaron diferentes experimentos de adhesión para determinar si concentraciones sub-letales de antimicrobianos: a) Actúan sobre las bacterias y células HEp-2 b) Actúan sólo sobre las bacterias, c) Actúan sólo sobre las células HEp-2, d) Separan las bacterias previamente adheridas a las células HEp-2 o e) Modifican la capacidad adherente de las bacterias tratadas, pero no adheridas previamente. La técnica de tinción de Giemsa y la qPCR nos permitió evaluar el patrón de adhesión y la expresión de genes, respectivamente. Después de los ensayos de adhesión, demostramos que los antimicrobianos afectaron solo a las bacterias; reduciendo  $\leq 65\%$  ( $P < 0.05$ ) la adhesión de *E. coli* a las células HEp-2. El carvacrol alteró el patrón de adhesión agregativo en *E. coli* O104:H4 y el ensayo de expresión génica indicó variaciones en la expresión de genes relacionados con la adhesión *aggR*, *pic*, *aap* *aggA* y *eae* en *E. coli* y del estrés oxidativo (SOD1, SO2, CAT y GPx) en células HEp-2. Las concentraciones sub-letales de antimicrobianos inhibieron la adhesión de las cepas de *E. coli* a las líneas celulares y alteraron el patrón de adhesión agregativo debido a la modificación en la expresión de genes de virulencia asociados.

## 2. ABSTRACT.

It is known that the adhesion of bacteria to the intestinal mucosa facilitates the internalization of pathogenic microorganisms and the development of pathological processes in humans. *E. coli* O104:H4 is considered a hybrid serotype sharing virulence factors from enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) *E. coli* pathotypes. The objective of this study was to analyze the effect of natural and synthetic antimicrobials (carvacrol, oregano extract, brazilin, palo de brasil extract and, rifaximin) on the adhesion of EHEC, EAEC and the hybrid serotype O104:H4 to HEp-2 cells and the expression of genes involved in this process. Two concentrations of antimicrobials, that did not affect ( $P < 0.05$ ) growth or damage bacterial cells were used. Experiments were conducted to determine if subinhibitory concentrations of antimicrobials inhibit adhesion by a) Affecting bacteria and HEp-2 b) Affecting only bacteria, c) Affecting only HEp-2 cells, d) Detaching bacteria previously adhered to HEp-2 cells or e) Modifying the adherent capacity of non-adhered treated bacteria. Giemsa stain and qPCR technique allowed us to assess the adhesion pattern and gene expression respectively. Results demonstrated that antimicrobials affected only bacteria; inhibiting  $\leq 65\%$  ( $P < 0.05$ ) the efficiency of *E. coli* to attach to HEp-2 cells. Carvacrol also altered the aggregative pattern of adhesion *E. coli* O104:H4 on cells. The gene expression assay indicated variations in the expression of adhesion-related genes *aggR*, *pic*, *aap* *aggA* and *eae* in *E. coli* and SOD1, SO2, CAT, and GPx in HEp-2 cells. Subinhibitory concentrations of antimicrobials inhibit adhesion of *E. coli* strains to cell lines and, alter the aggregative pattern of adhesion due to the modification in the expression of associated virulence genes.

### 3. INTRODUCCIÓN

Durante la primavera de 2011, se inició en Alemania un brote excepcionalmente virulento causado por una cepa híbrida de *E. coli* serotipo O104: H4, resistente a múltiples fármacos que se dispersó rápidamente a otros países provocando 2,987 casos de gastroenteritis aguda, de los cuales 855 desarrollaron una complicación grave conocida como síndrome urémico hemolítico (SUH) y 56 muertes (Robert Koch-Institut, 2011). Las apariciones adicionales de casos esporádicos de SUH en Francia debido a esta misma bacteria, sugirieron que este patógeno se había establecido endémicamente en Europa y muy probablemente en la población humana (Navarro, 2015).

El serotipo O104:H4, es una cepa de *E. coli* enteroagregativa típica (EAEC), que adquirió el bacteriófago que codifica para la toxina Shiga (Stx) 2a de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, Johnson & Stell, 2000; Bielaszewska *et al.*, 2006). Debido a estas características híbridas, se considera que pertenece a un nuevo patotipo: *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica (EAHEC, Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

Las cepas EAEC, incluido el serotipo O104:H4, se caracterizan por manifestar fenotípicamente adherencia agregativa estándar (AA), que se define como la capacidad de las bacterias para adherirse entre sí en la superficie de células epiteliales como las HEP-2 (Jensen, 2014), presentando la apariencia de una estructura tipo ladrillos apilados seguido de la síntesis de una capa de moco (Harrington, 2005). En contraste, EHEC es un subgrupo del patotipo de *E. coli* que produce toxina Shiga (STEC), y que causa un amplio espectro de enfermedades humanas que también incluyen el SUH (Mellmann *et al.*, 2009), pero a diferencia de EAEC las cepas de EHEC se adhieren a la mucosa intestinal mediante un mecanismo de adherencia localizada (AL).

El SUH provocado a partir de la presencia de toxina Shiga en las células renales se desarrolla en el 25% de los pacientes infectados con *E. coli* O104:H4, en contraste, con solo el 2% por *E. coli* O157:H7, sugiriendo que en las infecciones causadas por la cepa híbrida O104:H4 la Stx2a cruza la mucosa intestinal de manera más eficiente y/o en mayores cantidades, tal vez como consecuencia de la colonización simultánea en diferentes segmentos intestinales, o debido a una mejor colonización del intestino que facilita la absorción sistémica de Stx2 debido a la mayor capacidad de adherencia de esta cepa a las

células epiteliales intestinales (Knutton, *et al.*, 1989; Navarro, 2015); a pesar de que la verdadera razón permanece sin identificar, se han considerado importantes algunos factores como el sexo, la edad y las preferencias dietéticas que influyen en el desarrollo y la gravedad de los síntomas (Piérard *et al.*, 2012).

El consumo de alimentos contaminados, principalmente carne molida y productos de ganado, son rutas de transmisión regulares para EHEC (Callaway *et al.*, 2010); mientras que en el caso de EAEC los episodios están relacionados con el consumo de alimentos, sin embargo, no se ha implicado ningún vehículo definido (Nataro, 2005).

Un hallazgo importante es la alta resistencia a los antibióticos (ampicilina, trimetoprima, cefalosporinas y tetraciclina) presente en *E. coli* O104:H4 (Cahill *et al.*, 2017), razón por la cual el uso de antibióticos para tratar las infecciones por este microorganismo es controvertido. Teóricamente, el tratamiento con antibióticos puede conducir a una mayor toxicidad durante la fase prodrómica de la diarrea, debido a la liberación masiva de Stx por la muerte bacteriana (Menne *et al.*, 2012). Sumado a esto, se ha demostrado que las concentraciones sub-letales de algunos antibióticos pueden estimular el proceso de adhesión bacteriana (Olivares *et al.*, 2017).

Debido a todo esto, la búsqueda de compuestos efectivos contra *E. coli* O104:H4 se ha convertido en una necesidad real. Previamente en nuestro laboratorio se determinó el efecto de compuestos naturales en la producción de factores de virulencia en este microorganismo, como extractos de *Lippia graveolens* y *Haematoxylon brassiletto* y sus compuestos mayoritarios, carvacrol y brasilina que modificaron la motilidad, formación de biopelículas y la expresión de los genes relacionados (García-Heredia *et al.*, 2016). En este estudio se investigaron los efectos de las concentraciones sub-letales de antimicrobianos sobre la capacidad de adhesión de EHEC, EAEC y el serotipo híbrido O104:H4 a la línea celular HEP-2.



## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Características generales de *E. coli*.

Los diferentes patotipos de *E. coli*, incluyen organismos anaerobios facultativos, la mayor parte de vida libre, y algunos son comensales de animales vertebrados e invertebrados. Sin embargo, también pueden algunas cepas ser patógenas causantes de enfermedad. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5  $\mu$  de ancho por 3  $\mu$  de largo, Gram negativos, generalmente móviles (Müller *et al.*, 2008), no esporulados, fermentadores de glucosa y lactosa, catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen nitratos a nitritos (Scheutz *et al.*, 2011).

Son bacterias mesófilas, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, con rangos que van de 7°C, a 70°C. El pH y la actividad de agua ( $a_w$ ) óptimos son de 7.2 y 0.99 respectivamente, encontrándose los rangos de pH 3.8 a 9.5 y  $a_w$  inferiores a 0.94. El amplio rango de supervivencia a los factores medio ambientales, le permite estar presente en diversos ambientes (Chekabab *et al.*, 2016).

En el tracto gastrointestinal podemos encontrar a *E. coli* como parte de la microbiota comensal (que abarca más de 3 millones de genes y aproximadamente  $10^{14}$  células microbianas diferentes). Estudios epidemiológicos moleculares han clasificado a las diferentes cepas de *E. coli* en filogrupos: A, B1, B2, D y E. Los patotipos involucrados en infecciones extraintestinales se han denominado ExPEC3 y los productores de Stx STEC. Las cepas causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenicos, cada uno definido por su epidemiología, patogénesis (Figura 1), clínica y tratamiento: EPEC enteropatgénica, ETEC enterotoxigénica, EHEC enterohemorrágica, EIEC enteroinvasiva, DAEC adherencia difusa y EAEC enteroagregativa (Farfán *et al.*, 2016), aunque se ha propuesto también el patotipo EAHEC, enteroagregativo hemorrágico.

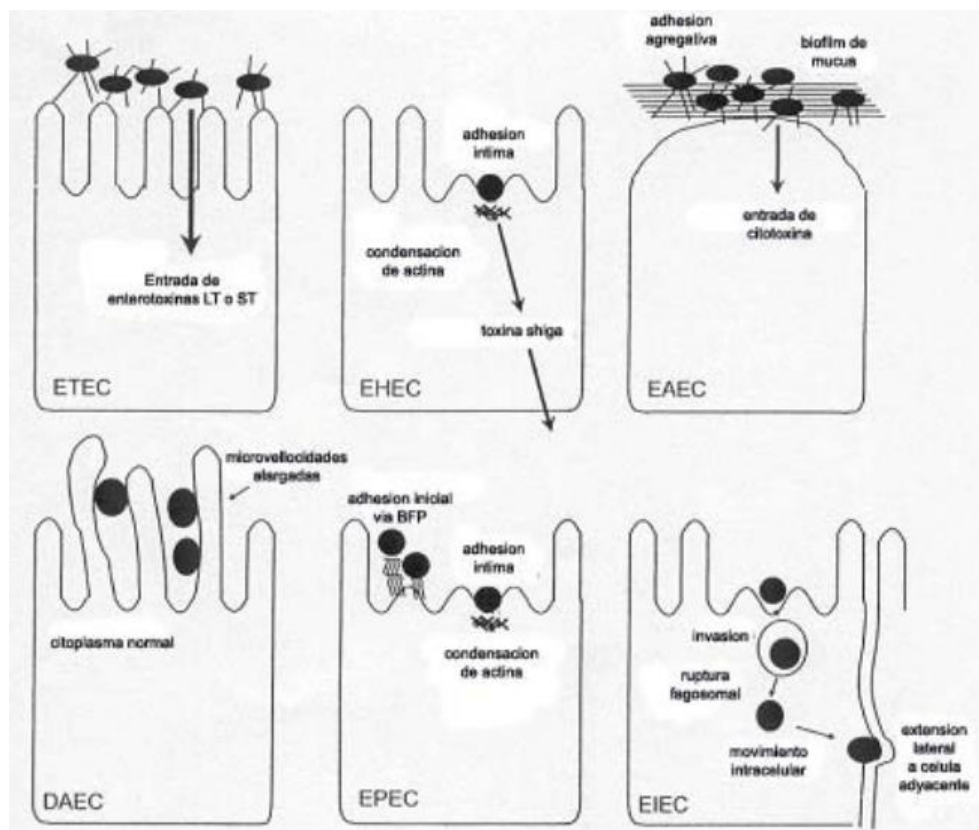


Figura 1. Patotipos de *E. coli* causantes de diarrea. Fuente de la imagen Nataro & Kaper, 1998.

Como la mayoría de los patógenos de la mucosa intestinal, *E. coli* sigue una estrategia de infección: adhesión, colonización del sitio mucoso, evasión de las defensas del hospedero, multiplicación y daño al hospedero. La habilidad más conservada dentro de las cepas diarreicas de *E. coli* es la de colonizar la superficie de la mucosa intestinal a pesar de la peristalsis y competencia por nutrientes a nivel intestinal (Nataro & Kaper, 1998).

#### 4.2. Serotipo *E. coli* O104:H4. Epidemiología y prevalencia genética.

Epidemiológicamente el serogrupo EAEC, se ha implicado como agente responsable de brotes de diarrea en diferentes partes del mundo, específicamente la diarrea acuosa en viajeros. Se describe como un patógeno entérico emergente, teniendo reportes de alta incidencia en Israel, Mongolia, India, Congo, Reino Unido y EUA. El principal brote de SUH presentado en el año 2011 fue causado por la cepa enteroagregativa O104:H4, el cual se inició en Europa central, principalmente en Alemania (Biliński *et al.*, 2012).

Los aislamientos de estos brotes, incluido el 2011C-3493, aislado de un paciente de EUA, con antecedentes de viajes a Alemania, expresan la toxina Shiga 2 (stx2), que generalmente se asocia con cepas enterohemorrágicas (EHEC). Sin embargo, las cepas del brote están filogenéticamente relacionadas con *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Las características híbridas de O104:H4 indicaron que pertenecen a un nuevo linaje conocido como *E. coli* hemorrágica enteroagregativa (EHAEC). Las cepas aisladas del brote alemán y las de las infecciones esporádicas en Francia forman un clado separado (Clado 1) distinto de los aislados O104:H4 enteroagregativos históricos, como la cepa 55989 recuperada de África Central en 1995. EAHEC O104:H4 también ha causado casos de SUH en la República de Georgia donde se aislaron en 2009 las cepas 2009EL-2050 y 2009EL-2071 (Ahmed *et al.*, 2012). El único reservorio conocido de este serotipo lo constituyen los seres humanos.

Las manifestaciones clínicas reportadas para este proceso infeccioso incluyen desde diarreas autolimitadas que remiten en pocos días, hasta patologías severas, como el SUH, diarrea y orina con sangre. En el caso del síndrome urémico hemolítico, caracterizado por la tríada de insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia cuando se asocia a diarrea en niños generalmente tiene su origen en bacterias productoras de toxina Shiga, principalmente del serotipo O157:H7, que utiliza como reservorio habitual a los rumiantes. Las principales rutas de transmisión incluyen la ingestión inadvertida de materia fecal, por ejemplo, a través de alimentos/agua contaminados y por contacto con animales de granja/humanos infectados (Richardson *et al.*, 1998). En contraste, en adultos, el SHU con diarrea prodrómica, que indica una causa infecciosa, es un evento raro. En el brote de Alemania causado por *E. coli* O104:H4, la mayoría de los pacientes con SUH eran adultos (88%; mediana de edad, 42 años) y principalmente mujeres (68%, Frank *et al.*, 2011).

#### ***4.3. Importancia de la adhesión en los patotipos EHEC y EAEC.***

El serotipo más frecuente y virulento del patotipo EHEC es el O157:H7, seguido del O26:H11, ambos productores de dos potentes citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 y Stx2), razón por la que se conocen como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés). En las cepas de EHEC se presenta un conjunto de factores de virulencia muy bien caracterizados que codifican para el fenotipo de adherencia localizada (Figura 2),

para lo cual utiliza factores de virulencia codificados en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, locus for enterocyte attaching/effacing) representados en este caso por la adhesina bacteriana intimina (gen *eae*), el receptor de intimina translocado (Tir) y el sistema de secreción tipo tres (T3SS) (Fedorchuk *et al.*, 2019; Haack *et al.*, 2003; McWilliams *et al.*, 2015).

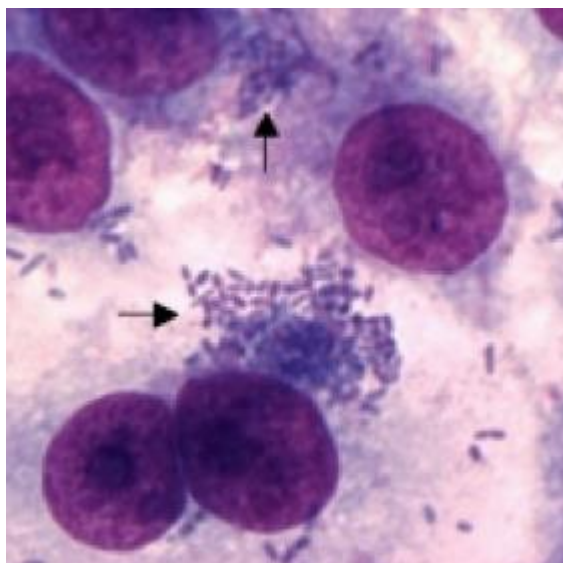


Figura 2. Adherencia localizada de células de *E. coli* sobre células epiteliales HEp-2. Fuente de la imagen Vidal, 2014.

Las cepas EAEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presentan sobre las células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con apariencia de ladrillos apilados ("*stacked brick*", Figura 3), observados tanto sobre las células como en el fondo de la placa. Usualmente no se reconocen como productoras de Stx, excepto la cepa O104:H4 hipervirulenta, la cual es atípica en muchos aspectos, siendo híbrida de dos patotipos ya que presenta adherencia agregativa y produce Stx del subtipo Stx2a, una combinación de factores de virulencia poco frecuente. Este serotipo híbrido es muy raramente aislado, solo se ha encontrado en humanos y a diferencia de EHEC nunca se ha encontrado de animales.

Esta es una de las miles de cepas que emergen continuamente, como consecuencia de la transferencia horizontal de genes (fagos, plásmidos y transposones) y la presión selectiva ambiental (Casey *et al.*, 2011).

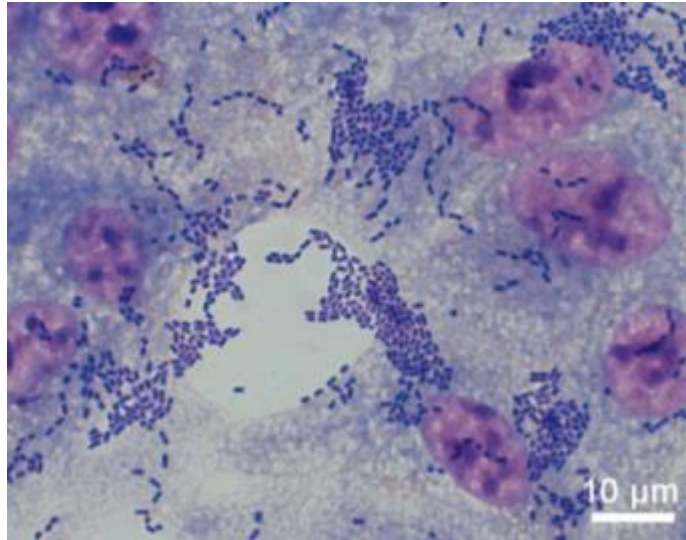


Figura 3. Patrón de adherencia agregativa "ladrillo apilado" de *E. coli* O104: H4 en células epiteliales intestinales HCT-8. Fuente de la imagen Karch *et al.*, 2012.

Sin embargo, consideramos importante mencionar que el serotipo *E. coli* O104:H4 carece de los factores de virulencia que caracterizan a las cepas STEC, el más importante la isla de patogenicidad LEE que codifica distintos factores implicados en la patogenia como describimos previamente, no está presente en este serotipo. Utilizando métodos genotípicos validados, los investigadores han demostrado que la cepa híbrida no es una típica STEC virulenta, sino un patotipo híbrido raro, que porta la codificación mediada por fagos para producir la Stx2a, pero con una base genética de EAEC (Scheutz *et al.*, 2011).

Los principales factores genéticos de *E. coli* O104:H4 (Figura 4), que contribuyen a su capacidad de causar enfermedades son genes típicos del patotipo EAEC tales como: *attA*, *aap*, *aggR*, *aggABCD* y, *sepA* que se encuentran en el plásmido pAA, y codifican a los principales componentes responsables de la adherencia agregativa que son las fimbrias de adherencia agregativas (FAA) y la dispersina (Mohamed *et al.*, 2007). Se han descrito otros factores de virulencia que aumentan su patogenicidad, siendo los más reconocidos: adhesinas, enterotoxina termoestable (EAST1), toxina Pet y una proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic, Nunes *et al.*, 2013 ; Navarro-Garcia, 2015).

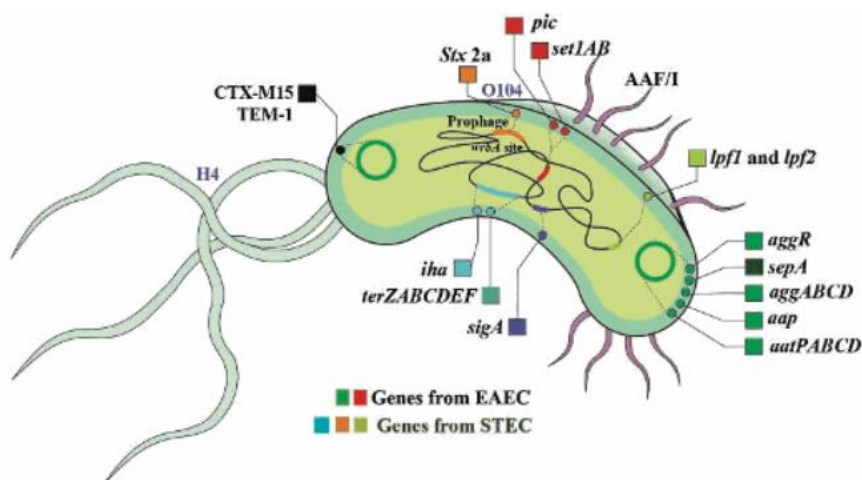


Figura 4. Características híbridas de O104:H4 y representación esquemática del origen de los genes asociados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos (EAEC/STEC). Fuente de la imagen Navarro-García, 2015.

#### **4.4 Factores de *E. coli* O104:H4 que promueven la colonización en el hospedero.**

El incremento de la adherencia al epitelio intestinal humano del serotipo O104:H4, se encuentra mediado por adhesinas putativas tales como la fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I) y las adhesinas homólogas (Iha, Ross *et al.*, 2015), las cuales facilitan la absorción de la Stx2 y explican la alta frecuencia de pacientes que desarrollan SUH (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Aparentemente, la producción de Stx en combinación a un sistema de adhesión alternativo (enteroagregativo) le ha permitido a esta bacteria realzar su virulencia, un ejemplo es la reducción a 5 días del tiempo medio entre el inicio de diarreas y el desarrollo de SUH, más corto que el período de 7-10 días observado en *E. coli* O157 (Karch *et al.*, 2012).

En general, el mecanismo de patogénesis del serotipo O104:H4 es aún desconocido, usando información de lo que ocurre en EAEC, se puede predecir que la bacteria se une a la superficie intestinal e induce el incremento de la secreción de moco. El exceso de moco atrapa a las bacterias que se unen en la formación del fenotipo agregativo, para mejorar la virulencia, persistir por períodos prolongados e iniciar la secreción de enterotoxinas y citotoxinas. La infección al final resulta en lesiones destructivas, acortamiento de vellosidades, necrosis hemorrágica y una leve respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear de la submucosa. Por ser esta bacteria capaz de producir

biopelículas *in vivo*, el mejor modo de prevenir y controlar la infección parece ser a nivel de la adhesión y por consiguiente la colonización (Safadi *et al.*, 2012).

Aunque estudios previos en cepas EAEC, demostraron que la colonización y la formación de “ladrillos apilados” es el resultado de la fimbria de adherencia agregativa I (FAA/I) ubicada en el plásmido pAA de 65-MDa, otras investigaciones cuestionan la responsabilidad que tiene este factor durante la colonización, ya que un reporte demostró que la carencia de pAA, no afectó la colonización de *E. coli* O104:H4 en conejos, sugiriendo que otros factores pueden intervenir para colonizar el epitelio intestinal por parte de la bacteria (Munera *et al.*, 2014).

#### **4.5. Toxina Shiga 2a. Factor de virulencia que desencadena la respuesta inmune.**

Se conocen dos toxinas Shiga en *E. coli*, las Stx1 y Stx2, las cuales están codificadas en el genoma de profagos, (Rohde *et al.*, 2011) presentándose 3 subtipos de Stx1 (a,c,d) y siete de Stx2 (a, b, c, d, e, f, g). Todas estas Stx están compuestas por la subunidad A y B, donde la A posee dos dominios proteínicos denominados A1 y A2; en tanto que la B consiste de cinco subunidades que forman un pentámero, cada una de ellas es capaz de unirse a la globotriaosil ceramida (Gb3) que es el linatural de Stx1 y Stx2, aunque Stx2 puede unirse también a Gb4. La subunidad A de las Stx varía poco y las B poseen la misma cadena polipeptídica que la toxina de *Shigella dysenteriae* (Blanco, 2012).

La unión de las Stx con las células blanco exige su interacción específica con receptores de la superficie celular. La expresión de los receptores Gb3, tanto en cantidad como en tipo determina la susceptibilidad de los tejidos afectados. Se ha podido comprobar que el butirato estimula la expresión de Gb3 y por ello el producido en el colon es absorbido por los colonocitos y podría aumentar la susceptibilidad de los mismos a las Stx (Louise & Obrig, 1995). La interacción entre las toxinas Stx se realiza a través de sus cadenas B, en donde cada una posee tres sitios de fijación a Gb3. Después de la fijación, se produce la invaginación de la membrana plasmática (Sandvig & Deurs *et al.*, 2002) iniciando transporte desde el endosoma al complejo de Golgi utilizando una sección de la vía secretora llamada vía retrógrada (Figura 5, flechas moradas). La toxina alcanza el retículo endoplásmico (RE) donde se escinde y entonces la subunidad A ingresa al citoplasma y

bloquea la síntesis de proteínas en el ribosoma, provocando la toxicidad (Figura 5; Karch *et al.*, 2012).

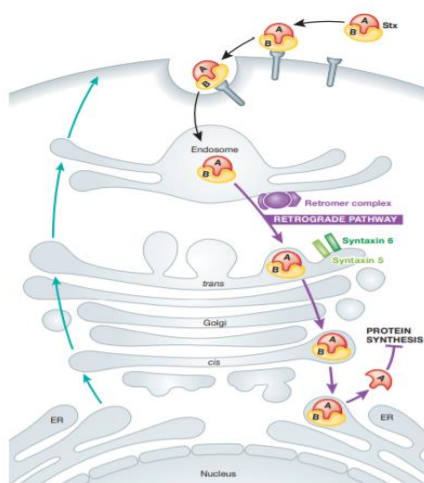


Figura 5. Modo de acción de la toxina Shiga. Fuente de la imagen Karch *et al.*, 2012.

El SUH se desarrolla debido a que las células del endotelio glomerular en el riñón son el blanco primario más importante de las Stx. Estas células poseen mayor densidad de receptores Gb3 por tanto las Stx se unen directamente a ellas, y cuya expresión está estimulada y favorecida por citoquinas liberadas por los monocitos activados durante la infección. Esta unión Stx-célula endotelial estimula la producción de NFκB que a su vez promueve la producción de MCP-1, IL-8 y FKN (fractalina) que junto con moléculas de adhesión favorecen el reclutamiento de los leucocitos y su fijación a las células endoteliales (Obrig *et al.*, 1993).

Por su parte Blanco en 2012 reportó que la capacidad enteroagregativa de la cepa O104:H4 le ha permitido el desarrollo de mecanismos que estimulan mayor liberación de Stx2a; aunque la expresión de estos factores de virulencia son atípicos en muchos aspectos.

#### **4.6. Resistencia a antibióticos. Potencial multiresistente de *E. coli* O104:H4.**

Una de las lecciones del brote ocurrido en Alemania del 2011, fue la capacidad de especies como *E. coli* de generar nuevas combinaciones de genes que conducen a la emergencia de cepas muy agresivas, que pueden ser resistentes a antibióticos (Touchon *et*



*al.*, 2009). La combinación de adhesión mejorada, capacidad de supervivencia, producción de Stx2 y resistencia antibiótica ilustran la alta plasticidad genómica de esta cepa de *E. coli* y ayuda a explicar la alta virulencia manifestada en los brotes que ocasiona (Figura 6).

La comparación de los genotipos, fenotipos y filogenia de cepas *E. coli* O104:H4 aisladas en 80 brotes, demuestra que es capaz de combinar mecanismos de virulencia, sin embargo no fue posible conocer el momento en que la cepa adquirió el plásmido que codifica para CTX-M-15, un fenotipo  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido que le confiere la multiresistencia que está presente, en la cepa intercontinental O25b:H4-ST131 con la cual comparte además el antígeno flagelar H4 (Wu, Hsueh, & Ko, 2011; Blanco, 2012). Este plásmido estaba ausente en el aislamiento original del serotipo *E. coli* O104 en el primer brote que se presentó en 2001 (Mellmann *et al.*, 2011).

En las cepas del brote de 2011 y los aislamientos posteriores recuperados de casos esporádicos en Francia, se descubrió que eran resistente a múltiples antibióticos, incluidas cefalosporinas de tercera generación (ceftiofur y ceftriaxona), ampicilina, estreptomicina, trimetoprima, sulfametoxazol, tetraciclina y sulfisoxazol, limitando severamente las opciones de tratamiento (Chowdhury *et al.*, 2015)).

La isla de patogenicidad GI3, es un punto de acceso para eventos genéticos dentro del genoma de O104:H4, exclusivo del Clado 1 (Grad *et al.*, 2013), se considera una región importante porque se ha demostrado que es móvil. GI3 se dirige a un punto de acceso genómico ampliamente disperso que consiste en una secuencia objetivo de 23 pb y, en consecuencia, puede ser importante en la aparición de futuros patógenos Multi Drogo Resistentes (MDR) en las *Enterobacteriaceae*. Además, alberga un complejo loci de genes de resistencia a antibióticos (CRL) que contiene genes que codifican para resistencia a la ampicilina (*bla*TEM-1), estreptomicina (*strAB*), sulfisoxazol (*sul1* y *sul2*), tetraciclina (*tetA A*) y trimetoprima (*dfrA7*; Chowdhury *et al.*, 2015).

Chattaway y colaboradores (2011) describieron la aparición de la cepa EAHEC O104:H4 como un nuevo desafío, principalmente por sus características de multiresistencia y la contraindicación en el uso de antibióticos en las infecciones causadas por cepas productoras de Stx, ya que el antibiótico puede inducir a la cepa a producir una mayor cantidad de la toxina, aumentando el riesgo de complicaciones como el SUH.

Los niveles de antimicrobianos requeridos para la inhibición de la replicación bacteriana, generalmente inducen una respuesta al estrés en el microorganismo cuyo efecto provoca la producción del fago y la expresión del gen *stx*; por lo cual el tratamiento antibiótico en las infecciones causadas por cepas STEC está generalmente contraindicado (Kimmitt *et al.*, 2000).

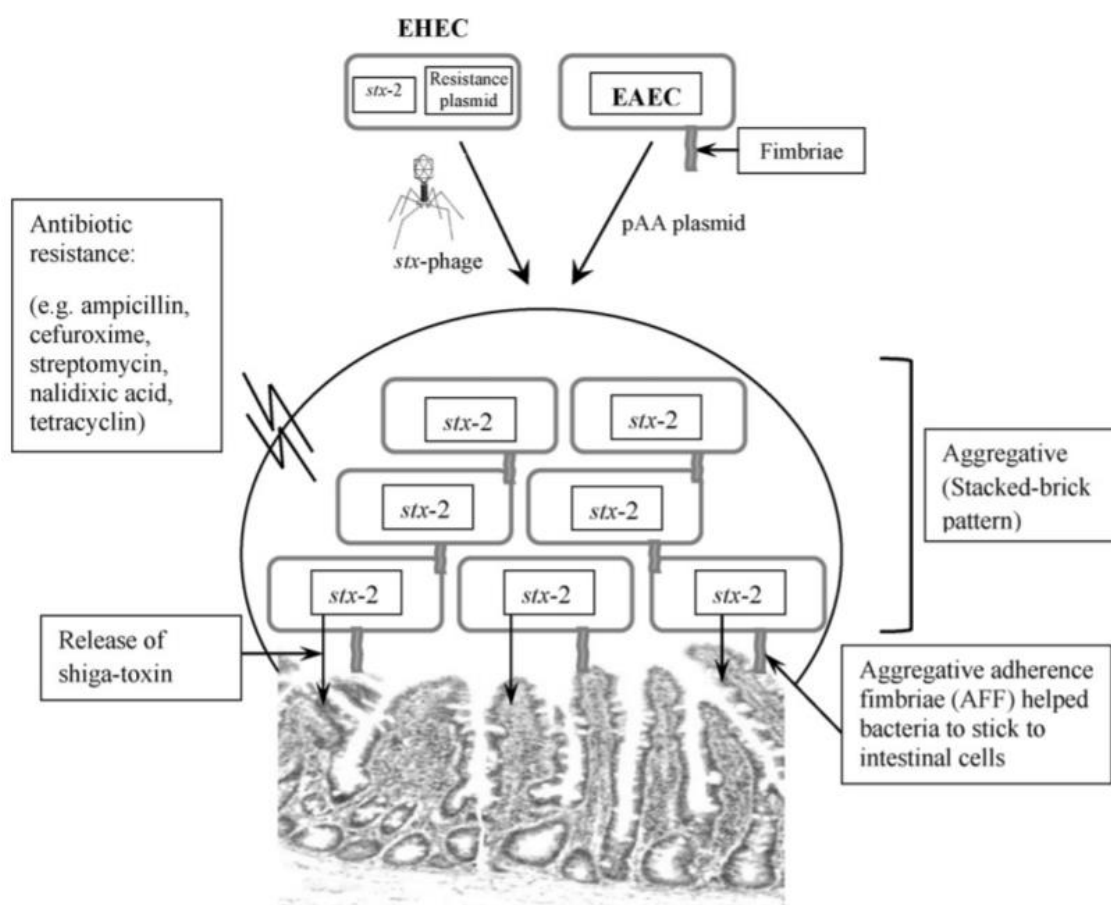


Figura 6. Patrón de adhesión de ladrillos apilados de *E. coli* O104:H4, donde se observa factores de alta virulencia: Stx2; plásmido pAA y resistencia a los antibióticos. Fuente de la imagen Soon *et al.*, 2012.

#### 4.7. Impacto de los compuestos naturales en la eficiencia de adhesión de *E. coli*.

Teniendo en cuenta la dificultad para el tratamiento de la infección producida por *E. coli* O104:H4 y sumado a que son cada vez más los consumidores que prefieren productos naturales, orgánicos o mínimamente procesados sin que se comprometa la inocuidad de los alimentos, se ha dirigido la atención a alternativas de control como

productos naturales con cualidades medicinales y de conservación a fin de extender la vida útil y prevenir el deterioro microbiológico de alimentos (Rabin, 2014). Sin embargo, aunque muchas de las propiedades antimicrobianas de las plantas, están fuertemente fundamentadas por distintas investigaciones en los campos clínicos y de alimentos por su efecto en bacterias, se conoce poco sobre los mecanismos de acción de estos compuestos naturales en concentraciones subletales (sub-CMB).

La actividad de los antimicrobianos naturales sobre la capacidad de adhesión de *E. coli* ha sido estudiada en diferentes patotipos, pero en *E. coli* O104:H4 hay muy poca información, es por eso que nuestro laboratorio destina recursos para aportar información relevante sobre la fisiología de este serotipo en presencia de concentraciones sub-CMB de antimicrobianos.

En el estudio que constituye el punto de partida de la presente investigación, se determinó el efecto de plantas y sus principios activos en el crecimiento, motilidad swarming, formación de biopelícula y expresión de genes de virulencia de EHEC O157:H7, EAEC *E. coli* 042 y EAHEC O104:H4. Una alta variabilidad en la motilidad swarming y el índice de formación de biopelículas fue observada dentro de las tres cepas analizadas cuando se expusieron a concentraciones sub-CMB de extracto de orégano, y carvacrol, extracto de *H. brasiletto* y brasilina y el antibiótico rifaximina, utilizado como último recurso terapéutico en el brote de Alemania en 2011 en pacientes gravemente afectados. La expresión de los genes evaluados en estas cepas de *E. coli* (*pic*, *aggR*, *stx* and *rpoS*) fueron influenciados ( $P \leq 0.05$ ) por los extractos/compuestos en su expresión (García-Heredia *et al.*, 2016).

Nuestra intención con la presente investigación es aportar avances que complementen el conocimiento sobre el serotipo hipervirulento O104:H4, y la posible inhibición de la expresión de algunos de los factores de virulencia relacionados a adhesión a partir de la aplicación de compuestos naturales, utilizando como patrones comparativos cepas de los patotipos EHEC y EAEC.

#### ***4.8. Actividad in vitro de compuestos naturales sobre la adhesión de microorganismos.***

Existen trabajos en donde se ha evaluado el efecto de productos naturales en la adhesión; Taylor y colaboradores (2011) evaluaron la capacidad del timol (que junto al

carvacrol son principios activos del extracto de orégano) para inhibir la adhesión de *E. coli* a células del epitelio vaginal humano, quedando demostrado que concentraciones de 0.5 a 0.03 de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) determinada redujeron la adhesión bacteriana, además las bacterias disminuyeron la capacidad hemaglutinante, lo cual esta correlacionado con la formación de fimbrias.

Burt y colaboradores (2007) investigaron el efecto de concentraciones subletales de carvacrol y *p*-cymene en la síntesis de proteínas en *E. coli* O157:H7 ATCC 43895; el carvacrol a 1 mM provocó la reducción en la producción de proteínas de choque térmico de 60 kDa (HSP60) e inhibió la síntesis de flagelina, provocando con esto la producción de células aflageladas y por tanto no móviles, sugiriendo que la capacidad adherente de la bacteria debió afectarse o ser nula.

El uso de concentraciones sub-letales de carvacrol en *Salmonella* Typhimurium inhibió completamente la motilidad bacteriana. Aunque la adhesión de *Salmonella* a IPEC-J2 (células epiteliales intestinales porcinas) no se vió afectada, la invasión fue reducida significativamente (Inamuco *et al.*, 2012). También Stratakos y colaboradores (2017) investigaron el efecto de este compuesto contra *E. coli* O157, O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O104 en la permeabilidad de la membrana, la integridad de la membrana y los niveles intracelulares de ATP. Estos investigadores demostraron el efecto inhibitorio del carvacrol sobre la adhesión a las células HCT-8. En 7 de los 8 serotipos de STEC evaluados, el carvacrol interfirió con el proceso de colonización y redujo la adherencia, sugiriendo que el producto ofrece de forma colateral protección contra la Stx, aunque en general este compuesto fue un potente antibacteriano.

Heredia y colaboradores (2005), demostraron el efecto del extracto etanólico de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento, producción de verotoxina y adhesión de *E. coli* O157:H7 a células HeLa. La inhibición en la formación de verotoxinas fue detectada a 1, 2 y 3 mg/ml. Pre-exponiendo la bacteria y las células HeLa a varias concentraciones de extractos, se afectó la adhesión de EHEC a la línea celular y la purificación parcial de la fracción activa del extracto sugirió que compuestos polifenólicos pueden jugar un papel importante en la actividad antimicrobiana que mostró este extracto.

La rifaximina, antibiótico poco absorbible derivado de la rifampicina, es eficaz de inhibir la síntesis de ARN bacteriano y se ha identificado tradicionalmente como un antibiótico bactericida de amplio espectro contra muchos patógenos entéricos que causan diarrea infecciosa, incluyendo *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Clostridium*, EAEC, ETEC, EHEC, EIEC, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Shigella* spp, (incluidas *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*), *Serratia* spp. y *Vibrio* spp. (Dupont, 2016).

Dogan y colaboradores (2018) determinaron el efecto de la rifaximina en la adhesión e invasión de EIEC a las células epiteliales Caco-2, T84 y HCT116. La rifaximina disminuyó la adhesión e invasión en 5 de las 6 EIEC estudiadas, en al menos una línea celular epitelial. Sin embargo, cuando trataron solamente a las células epiteliales T84 con rifaximina en el ensayo de adhesión, el antibiótico no tuvo ningún efecto sobre la capacidad adherente de *E. coli*.

Nuestra intención con la presente investigación es aportar avances que complementen el conocimiento sobre el serotipo hipervirulento O104:H4, y la posible inhibición de la expresión de algunos de los factores de virulencia relacionados a adhesión a partir de la aplicación de compuestos naturales, utilizando como patrones comparativos cepas de los patotipos EHEC y EAEC.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados tienen un alto impacto económico y en la salud pública. La contaminación de alimentos por microorganismos como *E. coli* son comúnmente reportadas, no obstante, algunos patógenos como el serotipo O104:H4 pueden adaptarse, sobrevivir y crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, causando patologías con considerables tasas de hospitalización y mortalidad. Se sabe que el primer paso para el desarrollo de procesos patológicos por estos microorganismos es la adhesión de la bacteria al epitelio intestinal, constituyendo esta un área de oportunidad para la búsqueda de compuestos que puedan afectar estos procesos y así evitar el desarrollo de procesos patogénicos.

La presente investigación, tiene su justificación en que son pocos los estudios realizados al serotipo híbrido O104:H4, sobre la aplicación de antimicrobianos naturales en dosis sub-inhedoras, y el efecto en su actividad genotípica y fenotípica. Los compuestos naturales tienen una tendencia social de incrementar su uso como preservativos de alimentos, en detrimento de los productos químicos que pueden ser tóxicos acumulativos que dañan la salud. Adicionalmente, existe contraindicación en el uso de antibióticos convencionales en el tratamiento de infecciones por *E. coli* productoras de Stx, por lo que es de gran interés la búsqueda de alternativas terapéuticas.

Por otro lado, la prohibición europea del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales ha aumentado la búsqueda de nuevas alternativas para prevenir las enfermedades microbianas intestinales en animales y estimular el crecimiento siendo un incentivo para investigar en esta línea de trabajo.

Por todo lo anteriormente planteado propusimos como objetivo de la presente investigación, determinar genotípica y fenotípicamente la acción de antimicrobianos naturales en la capacidad de adhesión de EHEC, EAEC y *E. coli* O104:H4 a la línea celular HEp-2.

## **6. HIPÓTESIS**

Varios compuestos naturales afectan la actividad fenotípica y la expresión genotípica de factores de virulencia relacionados con la adhesión de cepas de *E. coli* enterohemorrágica, enteroagregativa y del serotipo híbrido O104:H4.

## 7. OBJETIVOS

### *General*

Determinar fenotípica y genotípicamente la acción de antimicrobianos naturales en la capacidad de adhesión de *E. coli* enterohemorrágica, enteroagregativa y del serotipo híbrido O104:H4 a la línea celular HEp-2.

### *Específicos*

1) Determinar concentraciones sub-CMB de antimicrobianos naturales en los 3 serotipos de *E. coli* y su efecto en células HEp-2.

2) Establecer el efecto de concentraciones sub-CMB de antimicrobianos naturales en la capacidad de adhesión de 3 serotipos de *E. coli* a la línea celular HEp-2.

3) Medir la actividad de antimicrobianos naturales sobre la expresión de genes bacterianos relacionados con el proceso de adhesión: *aggR*, *aggA*, *aap*, *pic* y *eae* en *E. coli* y genes relacionados a estrés oxidativo SOD1, SOD2, CAT y GPx en la línea celular HEp-2.

4) Evaluar el efecto de compuestos naturales en la inhibición de la actividad del plásmido de adherencia agregativa (*pAA*) de *E. coli* O104:H4 y su participación en la agregación bacteriana, determinando posibles mecanismos de acción de los compuestos naturales que mostraron actividad.



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Bacterias y condiciones de cultivo.

EAHEC, serotipo O104:H4 fue adquirida comercialmente de la Universidad Estatal de Pennsylvania, EUA. La cepa EAEC serotipo 042 (aislada en Chile) fue amablemente donada por el Dr. Fernando Navarro, CINVESTAV-México y el serotipo EHEC O157: H7 (ATCC 43894) por la Dra. Lynn McLasborough (Departamento de Ciencia de Alimentos, Universidad de Massachusetts, Amherst MA, EUA). Las cepas se mantuvieron a -80 °C en caldo infusión Cerebro-Corazón (ICC, Bioxon, BD de México) con 20% de glicerol (Sigma-Aldrich, México). Los cultivos activos se prepararon transfiriendo una alícuota a tubos que contenían 16 ml de agar ICC e incubados durante 48 h/37°C. Los tubos se almacenaron a 4°C durante no más de 8 semanas. Para los ensayos, se transfirió una alícuota a tubos con 5 ml de caldo Mueller Hinton (MH, Difco, Maryland, EUA) o medio esencial mínimo de Eagle (MEM, ATCC® 30-2003™, Virginia, EUA) y se incubó durante la noche a 37°C.

### 8.2. Antimicrobianos

Las hojas de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) y la corteza de palo de brasil (Hb, *Haematoxylon brassiletto* Karsten) se obtuvieron de mercados locales y fueron identificadas por el Dr. Marco A. Guzmán (Departamento de Botánica, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás, N.L., México). Los extractos etanólicos se prepararon mezclando 100 g del material molido y seco con 500 ml de etanol al 96% (CTR, México). Los extractos se maceraron a temperatura ambiente durante 24 h, se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y la fracción líquida se colocó sobre platos de vidrio hasta la evaporación completa del etanol (48-72 h, García-Heredia *et al.*, 2016). Los extractos secos se rasparon y se resuspendieron con etanol al 96% y se mantuvieron a 4°C en matraces ámbar durante un período no mayor a 12 semanas. Se usó una alícuota para determinar el peso seco.

El carvacrol (Sigma-Aldrich, México) compuesto mayoritario del extracto de orégano y la brasilina (MP Biomedicals, California, EUA), compuesto mayoritario del extracto de palo de brasil, se disolvieron en solución de Tween 0.05% (v/v) y agua,

respectivamente Los compuestos comerciales y las soluciones madre se mantuvieron a 4°C en matraces ámbar, estas últimas por un período no mayor a 2 semanas.

La rifaximina (C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>, Sigma-Aldrich, México) que fue la primera elección utilizada durante el brote O104: H4 del 2011 (Bielaszewska *et al.*, 2011) se disolvió en etanol al 96% y se mantuvo a 4°C en matraces ámbar durante no más de 12 semanas. En todos los casos los antimicrobianos se prepararon las soluciones de trabajo al comienzo de cada experimento.

### **8.3. Concentración mínima bactericida (CMB)**

La determinación de la CMB, se realizó de acuerdo con el procedimiento de microdilución en placa (García-Heredia *et al.*, 2016). Se utilizaron placas de 96 pocillos (Corning, NY, EUA), donde en cada pocillo se añadió 100 µl de caldo MH2x, 20 µl de un cultivo de *E. coli* ajustado a  $2 \times 10^7$  UFC/ml y 80 µl de los antimicrobianos a diferentes concentraciones (0.03, 0.06, 0.12, 0.5, 1, 2 y 4% [v/v]), para obtener un volumen final de 200 µl. El control positivo consistió en caldo MH y cultivo bacteriano sin adición de antimicrobianos, mientras que el control negativo contenía solamente caldo MH. Después de incubar 24h a 37°C, la CMB se determinó tomando 10 µl de cada pocillo e inoculándolo por puntos sobre agar MH. Después de incubar por 24h / 37°C se consideró como CMB la concentración mínima en la cual no se observó crecimiento microbiano.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, la CMB de todos los antimicrobianos se determinó mediante el método estándar de microdilución en caldo. (García-Heredia *et al.*, 2016). En este estudio, se volvió a comprobar la CMB siguiendo el mismo método descrito anteriormente. Se detectaron pequeñas variaciones, y los datos obtenidos en este estudio se usaron como base para los siguientes ensayos.

### **8.4. Línea celular.**

Se adquirió la línea celular de carcinoma de cuello uterino humano HEp-2 (ATCC® CCL-23™, Virginia, EUA) y se mantuvo en nitrógeno líquido. Las células se activaron transfiriendo una alícuota a placas de cultivo de tejido de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, EUA) que contenía 3 ml de medio esencial mínimo de Eagle (MEM, ATCC®, Virginia, EUA) suplementado (MEMsup) con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina-

estreptomicina (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) y 10% de suero fetal bovino (Corning, NY, EUA) e incubados a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> (Steri-Cycle, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA.). En este trabajo se utilizaron las células entre los pasajes 7 a 30. Todos los experimentos se realizaron con MEM sin suplementos.

### ***8.5. Efecto de los antimicrobianos en la viabilidad de *E. coli* y las células HEp-2.***

#### ***a) Bacteria***

Una vez que se determinó la CMB, se estableció el efecto de concentraciones subinhibitorias (sub-CMB) de los antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano. Las bacterias se inocularon (2 ml,  $2 \times 10^7$  UFC/ml) en tubos con 18 ml de caldo MH o MEM con diferentes concentraciones de los antimicrobianos. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación (150 rpm, MaxQ Mini 4450, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) durante 12 h. Cada 2 h, se tomó una alícuota de muestra y se enumeraron las bacterias en agar MH. Los controles utilizados incluyeron bacterias cultivadas en caldo MH y MEM con agua en lugar de antimicrobianos, y medios con antimicrobianos sin bacterias. Se midió, además, el pH de los medios con antimicrobianos (Hanna HI9023; Hanna Instruments, Limena, Italia).

El daño bacteriano por efecto de los antimicrobianos se determinó evaluando la integridad de la membrana por citometría de flujo (Attune®, Applied Biosystems, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Para esto, las bacterias se cultivaron durante la noche, se ajustaron a  $5 \times 10^8$  UFC/ml y se expusieron a concentraciones sub-CMB de los compuestos durante 1 y 4 h (tiempos de exposición utilizados para ensayos de adhesión) y fueron incubados a 37°C con agitación (150 rpm). El daño bacteriano de las bacterias se analizó con el kit LIVE/DEAD (Invitrogen, 2004, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La fluorescencia de las bacterias se midió a los máximos de excitación/emisión de 535/617 nm usando el detector Blue Laser 3 (BL3). Todos los experimentos fueron evaluados con 30,000 eventos.

#### ***b) Línea celular HEp-2***

La viabilidad de las células HEp-2 por efecto de la exposición a los antimicrobianos se probó mediante ensayos con MTT como describió Mosmann (1983), con algunas modificaciones. Brevemente, las células se sembraron ( $1 \times 10^4$  células/pozo) en placas de 96

pocillos que contenían 200 µl de medio MEMsup, y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el 90% de confluencia, después de ~3-5 días se eliminó el medio y se añadieron 200 µl de medio nuevo que contenía concentraciones sub-CMB de los antimicrobianos, las placas se incubaron durante 4, 12 y 24 h. En cada tiempo de incubación, se observó la morfología celular con un microscopio invertido (40X Olympus CK40, Tokio, Japón). Posterior a la incubación se aspiraron los sobrenadantes y se añadió a cada pocillo 90 µl de medio RPMI-1640, sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, México) y 10 µl de bromuro de tetrazolio a 5 mg/ml (Sigma-Aldrich, México). Después de 3 h de incubación, se retiró el reactivo y se añadieron 100 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich, México) con HCl 0.04 N, para lograr la solubilización de formazán. La Absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch 2, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA) y la viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = DO \text{ de células control} / DO \text{ de células tratadas} * 100$$

#### **8.6. Efecto de los antimicrobianos en la adhesión de *E. coli* a las células HEP-2.**

En este estudio, se analizó el efecto de los antimicrobianos sobre la capacidad de adhesión de bacterias y/o células HEP-2 siguiendo el protocolo establecido por Cravioto y colaboradores (1979), con modificaciones. Las monocapas de células HEP-2 cultivadas hasta el 90% de confluencia en placas de 25 cm<sup>2</sup> con MEMsup, se dispersaron con 0.5 ml de tripsina (0.25% p/v, Sigma-Aldrich, México), y se contaron en cámara Neubauer (Vela Quin, México) y se ajustaron con MEMsup. Para los ensayos de adherencia, se colocaron alícuotas de 2x10<sup>5</sup> células en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia. El medio de cultivo se cambió cuando hubo variación de color (indicador de pH rojo fenol). Se realizaron diferentes ensayos para tratar de dilucidar el efecto de los antimicrobianos:

a) Los antimicrobianos actúan principalmente sobre las bacterias, pero también sobre la línea celular, aunque en menor grado: este experimento se realizó para determinar si las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos afectaron la capacidad de unión de *E. coli* y de la línea celular HEP-2. En este caso, se inoculó una alícuota de *E. coli* en 5 ml de MEM, y se incubó durante la noche a 37°C. Los cultivos se ajustaron a 5x10<sup>7</sup> UFC/ml en MEM (A<sub>600</sub>=0.065) y se agregaron concentraciones sub-CMB de antimicrobianos. Después de

1 h a 37°C a 150 rpm, 200 µl (que contenían bacterias y antimicrobianos) fueron inoculados (proporción 100:1 bacterias:células HEp-2) a células HEp-2 en confluencia (cultivadas en placas de 24 pozos y lavadas dos veces con amortiguador de fosfato salino [PBS] 0.01 M, pH 7.4). Después de la incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h, las placas se lavaron para eliminar las bacterias no unidas.

El número de bacterias adheridas se determinó mediante la adición de 200 µl de solución de desoxicolato de sodio al 0.5% (Sigma-Aldrich, México) para separar las bacterias de las células eucarióticas. Se hicieron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, se colocaron sobre placas con agar MH y se contaron después de una incubación de 48 h a 37°C. El patrón de adherencia se determinó mediante tinción con GIEMSA y se recogió una muestra para ensayos de expresión génica en bacterias adheridas y también en las no adheridas (Figura 7).

El patrón de adhesión de las bacterias adheridas del serotipo O104.H4, se evaluó además por tinción de Giemsa, donde los portaobjetos fijado con Metanol por 20 min (Jalmek Científica, México) se tiñeron con solución de Giemsa (Sigma-Aldrich, México) recién diluida a 1/10 durante 30 min a temperatura ambiente, luego se lavó con agua destilada para eliminar los restos de colorante, se escurrió y se secó al aire.

Los portaobjetos teñidos se examinaron con una lente de inmersión en aceite 40x usando un microscopio de contraste de fase trinocular (Amscope, EUA). Se contaron los portaobjetos teñidos con Giemsa, utilizando el mismo aumento, pero con luz blanca transmitida y un filtro azul. Se realizó el conteo del número de bacterias y agregados bacterianos en un total de 40 campos utilizando cuadrícula ocular (Collins et al., 1980).

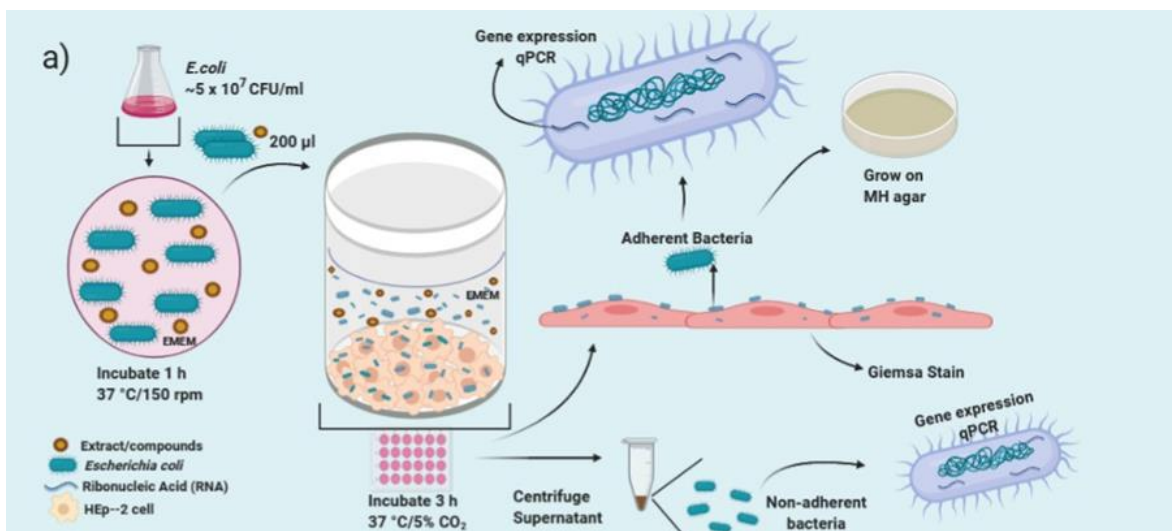


Figura 7. Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos, afectan la capacidad de unión de *E. coli* y en menor grado de células Hep-2.

b) Los antimicrobianos actúan únicamente sobre las bacterias para inhibir su adhesión a la línea celular HEp-2: este experimento se realizó para determinar si las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos afectaron la capacidad de *E. coli* para unirse a las células HEp-2. Se inoculó una alícuota de *E. coli* en 5 ml de MH o MEM, y se incubó durante la noche a 37°C. Los cultivos se ajustaron a  $5 \times 10^7$  UFC/ml en caldo MH o MEM y se agregaron concentraciones sub-CMB de antimicrobianos. Después de 1h a 37°C con agitación (150 rpm), los cultivos se centrifugaron a  $2,700 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente. Las bacterias se lavaron dos veces con PBS y se ajustaron a  $2 \times 10^8$  UFC/ml ( $A_{600} = 0.085$ ) en MEM sin suplementos. Se añadieron 200  $\mu$ l a placas de 24 pozos que contenían células HEp-2 confluentes en una proporción de 100:1 (bacterias:células HEp-2). Después de la incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h, las placas se lavaron para eliminar las bacterias no unidas. Se determinó el número de bacterias adheridas como se describió anteriormente (Figura 8).

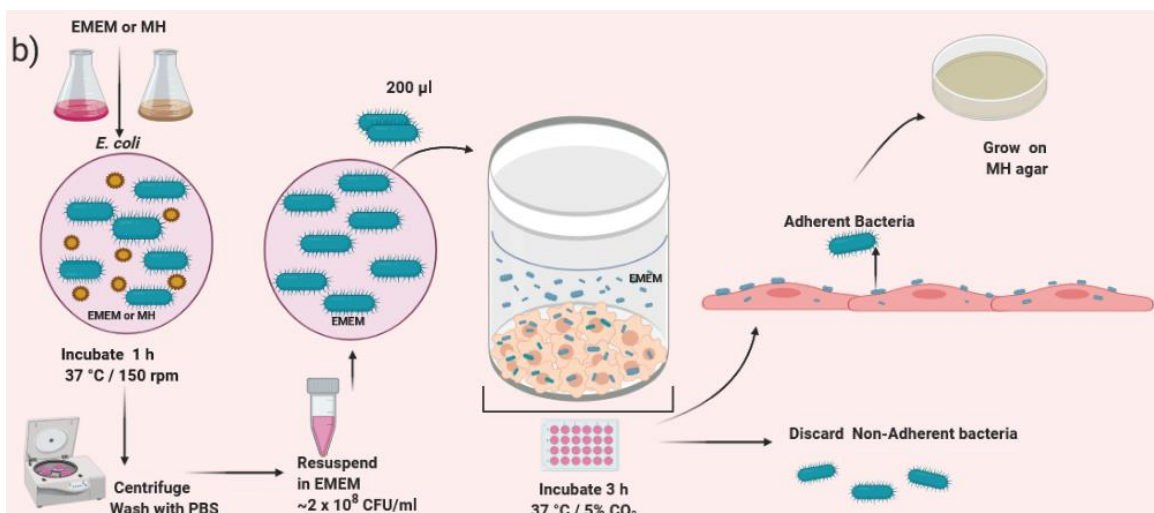


Figura 8. Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos, afectan la capacidad únicamente de *E. coli* para unirse a las células HEp-2.

c) Los antimicrobianos actúan únicamente sobre las células HEp-2 para inhibir su adhesión a las células bacterianas: este experimento se realizó para determinar si las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos afectaron la capacidad de las células HEp-2 para unirse a *E. coli*. En este caso, las células HEp-2 cultivadas en placas de 24 pozos a una confluencia del 90% se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 200 µl de MEM que contenía concentraciones sub-MBC de los antimicrobianos. Después de 1 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se aspiró el medio y se añadieron 200 µl de cultivos bacterianos ( $2 \times 10^8$  UFC/ml) cultivados en MEM (proporción 100:1 bacterias:células HEp-2). Después de la incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h, las placas se lavaron para eliminar las bacterias no unidas, y el número de bacterias adheridas se determinó como se describió anteriormente (Figura 9).

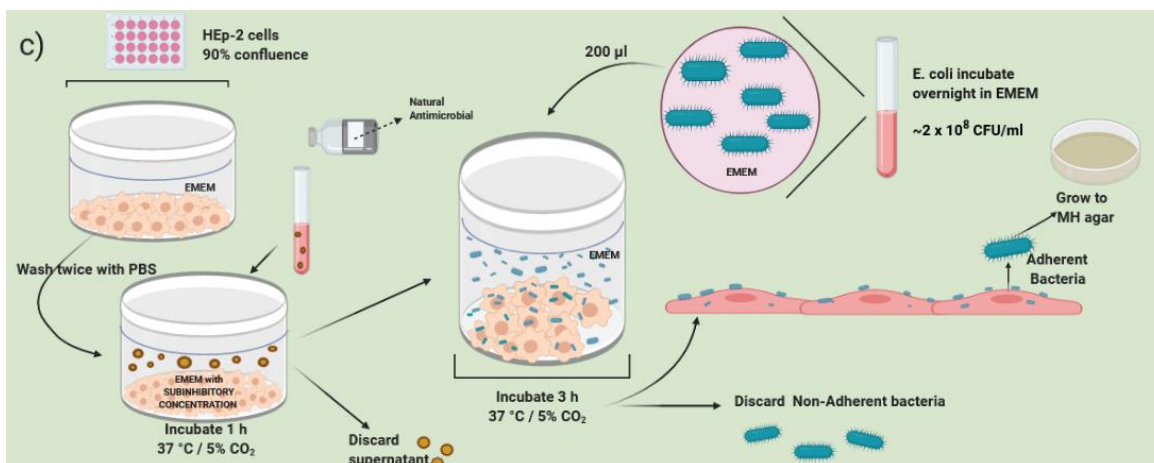


Figura 9. Diseño experimental para determinar si concentraciones sub-CMB de antimicrobianos afectan la capacidad de las células HEp-2 para permitir la unión de *E. coli*.

d) Los antimicrobianos pueden separar a las bacterias adheridas a células HEp-2: este experimento se realizó para determinar si las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos pueden alterar la unión de *E. coli*-HEp-2. En este caso, se inocularon placas que contenían células HEp-2 confluentes, con bacterias ajustadas en MEM como se describió previamente (proporción 100:1 bacterias:células HEp-2). Después de la incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h (para permitir la unión de las bacterias con la línea celular), se agregaron 200 µl de concentraciones sub-CMB de los antimicrobianos (resuspendidos en MEM), y se incubaron a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> por 3 h. Las placas se lavaron para eliminar las bacterias no unidas, y el número de bacterias adheridas se determinó como se describió anteriormente (Figura 10).





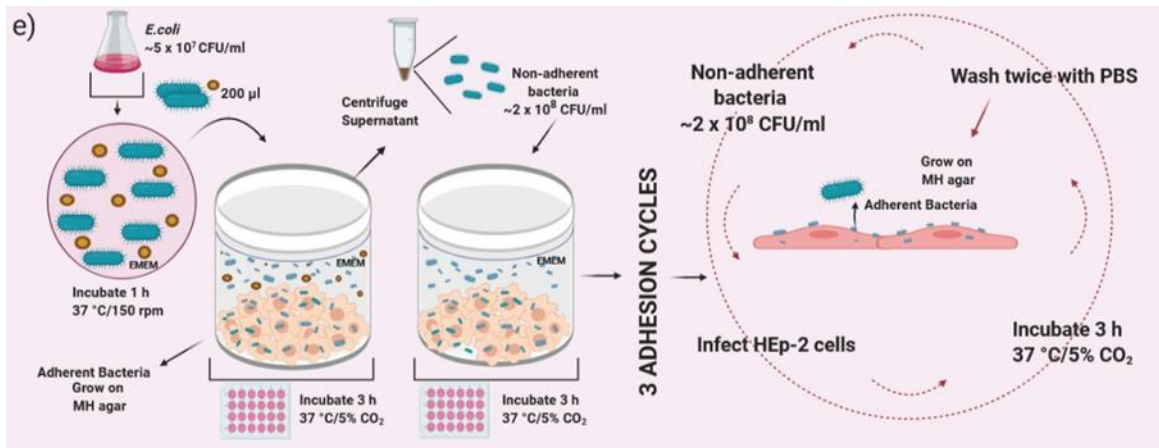


Figura 11. Diseño experimental para determinar si células de *E. coli* previamente expuestas a antimicrobianos, pero no unidas a células HEP-2 pueden conservar la memoria de inhibición de la adhesión.

### 8.9. Análisis de expresión génica.

La expresión los genes: *eae* (intimina, expresada por EHEC), *aggR*, *aap*, *aggA* y *pic* (activador transcripcional putativo, dispersina, proteína principal FAA y proteasa secretada, expresadas por EHAEC y EAEC, Tabla 1) se determinó de las bacterias unidas y no unidas del experimento a) que se expusieron a rifaximina, carvacrol y extracto de orégano. También se evaluó la expresión genética de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en la línea celular HEP-2 procedentes del mismo experimento.

Tabla 1. Genes y cebadores utilizados para detectar la expresión de genes de virulencia de cepas de *E. coli* y la expresión de genes de estrés oxidativo en células HEp-2, después del ensayo de adhesión.

Gen	Serotipo de <i>E. coli</i> y línea celular	Proceso fisiológico involucrado	Cebador u oligonucleótido secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>16S rRNA</i>	O104:H4 O157:H7 042 Chile	16S RNA ribosomal (gen constitutivo)	_F CGATGCAACGCGAAG _R CCGGACCGCTGGCAA	178	Safadi <i>et al.</i> 2012)
<i>aggR</i>	O104:H4 042 Chile	Activador transcripcional <i>aggR</i>	_F TTCCGATAAGGTCAGAAACACA _R TGCTGCTTTGCTCATTCTTG	169	Safadi <i>et al.</i> 2012)
<i>pic</i>	O104:H4 042 Chile	SPATE	_F CCTGACAGAGGACACGTTCA _R TCAACCCCTGTTCTTCCAAC	147	Safadi <i>et al.</i> 2012)
<i>aggA</i>	O104:H4 042 Chile	Proteína principal FAA	F_CAAACAACCTCAGACAATCCGCC R_AATCAACTGCAGCATGGAGTAT	206	Este estudio
<i>aap</i>	O104:H4 042 Chile	Dispersina	F_AAGTTTGTTATCTTTTCTGGCAT R_CCCATTTCGGTTAGAGCACTATA	131	Este estudio
<i>stx</i>	O104:H4 O157:H7	Shiga toxina 2a	F_GAAGATGTTTATGGCGGT R_CACTGTAAATGTGTCATC	115	Safadi <i>et al.</i> , 2012)
<i>eae</i>	O157:H7	Intimina (adhesina)	F_CATTATGGAACGGCA R_ACGGATATCGAAGCC	375	Este estudio
<i>RPS18</i>	HEp-2	18S RNA ribosomal (gen constitutivo)	F_TGTGGTGTTGAGGAAAGCAG R_AAGTGACGCAGCCCTCTATG	252	( Fillebeen <i>et al.</i> , 2013)
<i>SO1</i>	HEp-2	Cataliza la dismutación de superóxido, en	F_AGGGCATCATCAATTTTCGAG R_TGCCTCTCTTCATCCTTTGG	196	(Lozano <i>et al.</i> , 2016)
<i>SO2</i>	HEp-2	oxígeno y peróxido de hidrógeno	F_GGAACGGGGACACTTACAAA R_GGTAGTAAGCGTGCTCCCAC	110	(Lozano <i>et al.</i> , 2016)

<i>CAT</i>	HEp-2	Peróxido de Hidrógeno óxido reductasa	F_TAAGACTGACCAGGGCATC R_CAAACCTTGGTGAGATCGAA	201	(Lozano et al., 2016)
<i>GPx</i>	HEp-2	Reducción del peróxido a través del glutatión.	F_CAACCAGTTTGGGCATCAG R_CCCACCAGGAACTTCTCAAA	295	Este estudio

La extracción de ARN fue realizada utilizando el reactivo TRIzol (Bioline London, England). La integridad del ARN obtenido se determinó mediante su lectura espectrofotométrica a 260 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). La síntesis de ADNc se realizó con el kit de síntesis iScript™ (Bio-Rad, México) y la cuantificación de la expresión se analizó mediante PCR en tiempo real (PikoReal 96, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) con Q SYBR Green Supermix (Bio-Rad, México). Las condiciones de los ciclos fueron 95°C/3 min seguidas de 40 ciclos a 95°C/15s y 60°C/30s. Los resultados se normalizaron utilizando el gen constitutivo 16S por cuantificación relativa (método: Ct comparativo) expresado como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Haimes & Kelley, 2010) y, se analizó la expresión como número de veces relacionando la diferencia entre el valor del ciclo umbral del gen target y el gen de referencia, este último utilizado como normalizador (gen 16 S), representando el valor 1.

Se realizó una comparación de las expresiones promedio de  $\Delta C_q$  (media del triplicado de cada muestra). Para el análisis, la expresión ARN 16S fue el gen de mantenimiento, que permaneció estable ( $C_q 21.02 \pm 3.34$ ) en presencia de los compuestos antimicrobianos durante todo el ensayo (4 h). Las copias absolutas de ARNm se compararon mediante ANOVA y la prueba "Dunnet".

### ***8.8 Obtención de mutantes $\Delta aap$ y $\Delta aggA$ por recombinación homóloga.***

Los genes *aap* y *aggA* fueron propuestos para ser deletados por la técnica de recombinación homóloga (Datsenko & Wanner, 2000), para lo que fue necesaria la construcción del plásmido pKD46 con resistencia a espectinomicina (pKD46<sup>R esp</sup>) insertando una secuencia de 1475 pb (procedente del plásmido pUC57 modificado, Agentide, New Jersey, United States) que codifica para esta resistencia. La razón de esta construcción radicó en que el plásmido original necesitaba sensibilidad a ampicilina y

O104:H4 es resistente este antibiótico. Posterior a linearizar los plásmidos con la enzima *EcoRV* (Figura 12, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) y desfosforilarlo, se procedió a ligar la secuencia. El producto ligado se incorporó a *E. coli* DH5α por electrocompetencia (Figura 13).

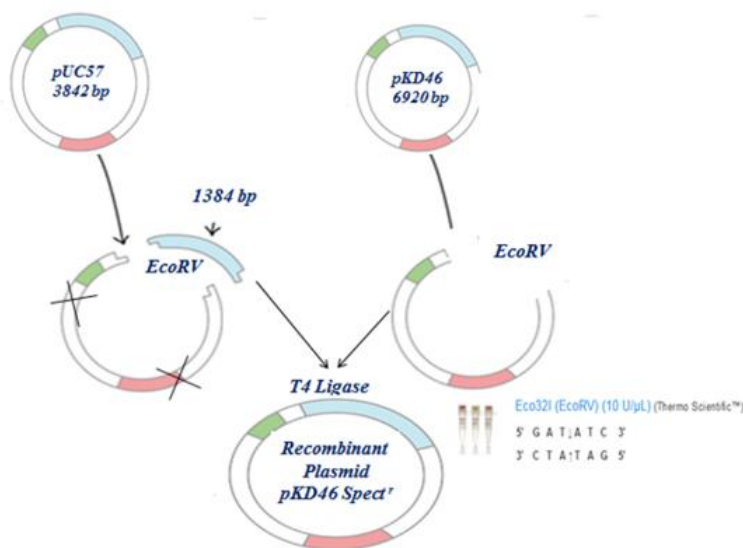


Figura 12. Esquema de la digestión de pUC57 y pKD46 con enzimas de restricción.

El plásmido pKD46 con resistencia a espectinomicina ( $pKD46^{R_{esp}}$ ) se extrajo de *E. coli* DH5α (Figura 14) y se utilizó para transformar a *E. coli* O104:H4. Por PCR punto final fue amplificado un segmento de ADN que codificó para resistencia a kanamicina (Iniciador Forward: 63 nt adyacentes al codón de inicio + tgtgtaggctggagctgctt e Iniciador Reverso: ctaaggaggatattcatatg + x 63 nt adyacentes al codón de paro) y detectó los sitios de reconocimiento en el gen blanco, este fue introducido por electrocompetencia en la cepa O104:H4 resistente a espectinomicina debido a la incorporación previa de  $pKD46^{R_{esp}}$ . Las células transformadas fueron seleccionadas en agar Luria Bertani (LB, Difco, Maryland, EUA) adicionado con 50 μg/ml de espectinomicina y 50 μg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich, México).

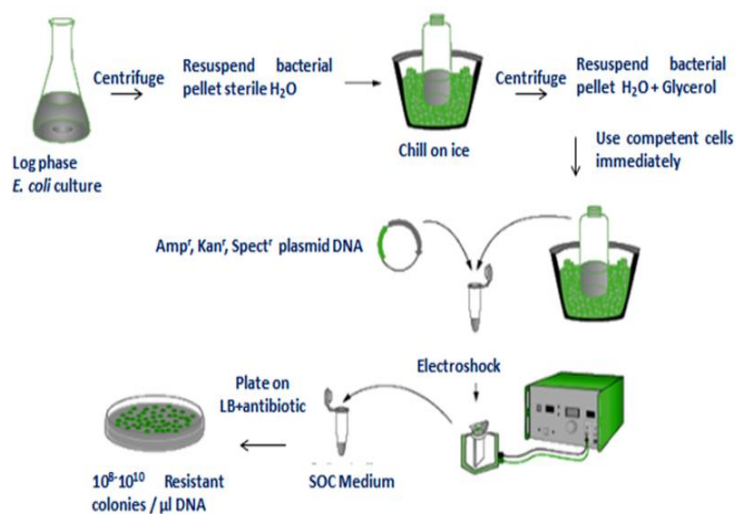


Figura13. Diagrama de preparación de células electrocompetentes.

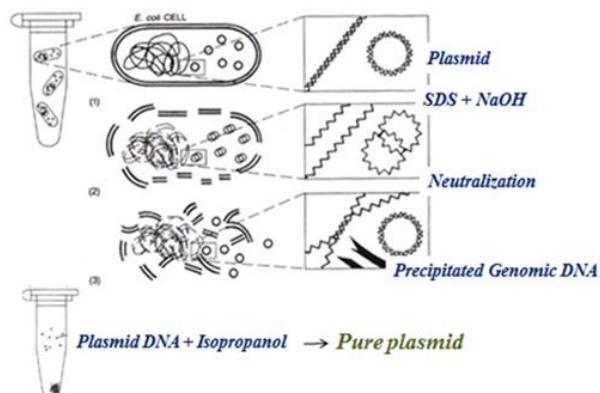


Figura 14. Diagrama de la extracción de plásmidos.

La eficiencia de la transformación en UFC/μg se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{UFC transformadas} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de colonias}) (\text{Coeficiente dilución}) (\text{Vol. original de transformación})}{\text{Volumen empleado en la placa}}$$

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{UFC transformadas}}{\text{ADN de plásmido (en } \mu\text{g)}}$$

### 8.9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics, Windows, Versión 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY, EUA) y Origin (Windows, Versión 9.0, Texas, EUA) para el diseño de los gráficos. La dependencia de la concentración de los

antimicrobianos y los valores medios se analizaron mediante un análisis de varianza ordinario seguido de la prueba de Duncan y Dunnett para comparar cada información entre el tratamiento y el control. La confiabilidad utilizada fue del 95%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y al menos en tres repeticiones en experimentos separados.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Efecto de los antimicrobianos sobre la viabilidad bacteriana.

Las CMB obtenidas se observan en la tabla 2. La rifaximina mostró CMB entre 0.02 y 0.03 mg/ml, en tanto que para el carvacrol (principio activo del extracto de orégano), fue de  $\leq 0.06$  mg/ml en todas las cepas, siendo los antimicrobianos que mostraron la mayor consistencia entre las cepas evaluadas.

En contraste, para la brasilina la CMB fue  $\leq 3.20$  mg/ml, variando 0.65 mg/ml entre las cepas, siendo la cepa EAHEC 0104:H4 la de mayor resistencia. Los extractos de orégano y Hb tuvieron CMBs de  $\leq 0.85$  y  $\leq 4.30$  mg/ml respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la CMB, determinamos las concentraciones sub-CMB de los antimicrobianos que se usarían en los experimentos de adhesión (Tabla 2). La viabilidad bacteriana se evaluó mediante el método de cuenta en placa en agar MH, seleccionando las concentraciones en que no se afectara el crecimiento.

Se evaluó la integridad de la membrana de *E. coli*, el pH del medio de cultivo (pH) y el efecto citotóxico de los antimicrobianos en las células eucariotas.

Tabla 2. Concentración mínima bactericida (CMB, mg/ml) de antimicrobianos en tres serotipos de *E. coli*. Los valores entre paréntesis indican las concentraciones sub-MBC utilizadas.

Cepas	CMB (mg/ml)				
<i>E. coli</i>	Rifaximina	Carvacrol	Orégano	Brasilina	Hb
EAHEC, STEC	0.03 $\pm$ 0.03ab	0.05 $\pm$ 0.01ab	0.75 $\pm$ 0.05c	3.20 $\pm$ 0.06c	4.30 $\pm$ 0.04d
O104:H4	(0.002 & 0.005)	(0.01 & 0.025)	(0.20 & 0.40)	(1.0 & 1.5)	(1.5 & 3.0)
EHEC, STEC	0.03 $\pm$ 0.03ab	0.06 $\pm$ 0.01ab	0.85 $\pm$ 0.04c	2.85 $\pm$ 0.05c	3.80 $\pm$ 0.04c
O157:H7	(0.002 & 0.005)	(0.01 & 0.025)	(0.20 & 0.40)	(1.0 & 1.5)	(1.5 & 3.0)
EAEC	0.02 $\pm$ 0.02a	0.06 $\pm$ 0.02ab	0.70 $\pm$ 0.02c	2.65 $\pm$ 0.05c	3.80 $\pm$ 0.05c
042 Chile	(0.002 & 0.005)	(0.01 & 0.025)	(0.20 & 0.40)	(1.0 & 1.5)	(1.5 & 3.0)

$\pm$ : Desviación Estándar. Las diferentes letras entre cepas indican diferencias significativas al comparar la medición de cada tratamiento por separado.



Las dos concentraciones sub-CMB seleccionadas de rifaximina, carvacrol, brasilina y extractos de orégano y Hb agregadas en los caldos MH y MEM por separado, no afectaron el crecimiento de *E. coli* durante las fases exponencial y estacionaria. Sin embargo, 0.01 mg/ml de rifaximina causó inhibición del crecimiento en las tres cepas, por lo que se analizaron concentraciones más bajas (0.005 y 0.002 mg/ml). La concentración 0.002 mg/ml no afectó el crecimiento bacteriano, en tanto que 0.005 mg/ml redujo la viabilidad ( $P \leq 0.05$ ) de EAEC 042 durante la fase exponencial (Fig. 15).

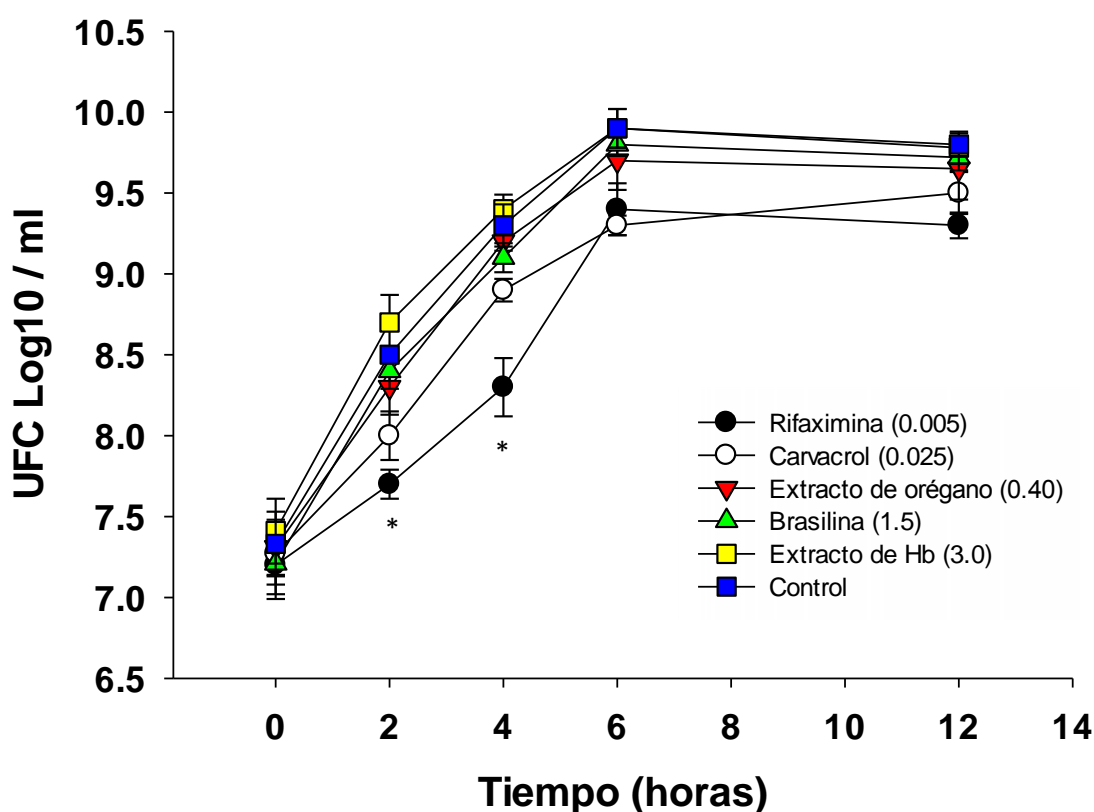


Figura 15. Viabilidad de *E. coli* 042 Chile en presencia de concentraciones sub-CMB de antimicrobianos (mg/ml).

Es bien sabido que las variaciones en el pH afectan la viabilidad de las líneas celulares y los microorganismos (Munder *et al.*, 2016) teniendo en cuenta ese aspecto, se analizó el pH de los medios MH y MEM con concentraciones sub-CMB de los

antimicrobianos. Aunque se observaron diferencias significativas (Tabla 3), los valores estuvieron entre 7 y 8, con excepción de 0.025 mg/ml de carvacrol.

Tabla 3. pH de medios de cultivo con compuestos antimicrobianos.

Sub-MBC	pH					
	Control	Rifaximina	Carvacrol	Orégano	Brasilina	Hb
	Caldo Mueller Hinton					
Alta	7.37 ±0.06b	7.81 ±0.10c*	6.97 ±0.21a*	7.59 ±0.25b	7.45 ±0.09b	7.21 ±0.17b
Baja		7.70 ± 0.05c*	7.54 ±0.07b	7.18 ±0.09b	7.06 ±0.12a*	7.24 ±0.13b
	Medio esencial mínimo de Eagle					
Alta	7.42 ±0.19b	8.08 ±0.14c*	7.34 ±0.13b	7.65 ±0.09b	7.84 ±0.18c*	7.25 ±0.12b
Baja		7.94 ±0.08c*	7.61 ±0.12b	7.36 ±0.10b	7.53 ±0.14b	7.13 ±0.15a*

±: desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias con el control. (\*) Significancia estadística (P≤0.05).

Los ensayos de integridad de la membrana bacteriana evaluados por citometría de flujo revelaron que la mayoría de los tratamientos de antimicrobianos no afectaron (P <0.05) la estructura bacteriana (Tabla 4) en los dos tiempos analizados (1 y 4 h), con excepción de los tratamientos con rifaximina en EAEC 042 y EAHEC O104:H4, se observó alto daño bacteriano.

Tabla 4. Estimación del porcentaje de mortalidad de *E. coli* por medición de la integridad de su membrana.

Porciento de mortalidad bacteriana							
Serotipo	Tiempo de exposición (horas)	Control	Rifaximina	Carvacrol	Orégano	Brasilina	Hb
EAHEC O104:H4	1	0.15 ±0.3a	0.56 ±0.6ab	0.09 ±0.1a	0.34 ±0.5a	0.07 ±0.09a	1.0 ±0.9a
	4	0.17 ±0.07a	0.81 ±0.9b*	0.13 ±0.2a	0.11 ±0.2a	0.12 ±0.2a	0.32 ±0.6a
EHEC O157:H7	1	1.43 ±0.7a	1.07 ±0.4a	1.30 ±0.5a	2.93 ±1.3b*	1.16 ±0.4a	0.77 ±0.3a
	4	2.88 ±0.9ab	1.04 ±0.6a	1.65 ±0.7ab	3.78 ±1.4ab	4.48 ±1.3b	1.05 ±0.3a
EAEC 042 Chile	1	0.94 ±0.5a	3.30 ±0.8c*	1.15 ±0.5a	0.46 ±0.2a	2.14 ±1.1b*	1.12 ±0.7a
	4	1.26 ±0.9ab	2.19 ±1.3c*	0.64 ±0.2a	0.71 ±0.2a	1.98 ±0.8bc	1.33 ±0.8ab

±: Desviación estándar

Diferentes letras indican la mortalidad bacteriana que difiere del control. (\*) Significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

### 9.2. Efecto de los antimicrobianos en la adhesión de *E. coli* a las células HEP-2.

Para determinar la actividad de los antimicrobianos sobre la capacidad de adhesión principalmente de *E. coli* pero en menor grado por células HEP-2, resultó necesario conocer primero si los compuestos afectaban la viabilidad de la línea celular HEP-2. Para esto, se utilizó la prueba MTT, en donde se mostró que el carvacrol (0.025 mg/ml) redujo ( $P \leq 0.05$ ) la viabilidad celular ~ 30% después de 4 h de exposición (Figura 16), por lo que se descartó su uso en los ensayos en donde se ponía en contacto el compuesto directamente sobre las células HEP-2. El resto de tratamientos, aunque manifestaron discreta variabilidad, algunos de ellos con reducciones inferiores al 10%, se consideraron aceptables (Munder *et al.*, 2016) para los ensayos subsecuentes. Un hallazgo importante detectado fue que la rifaximina y la brasilina (en ambas concentraciones) aumentaron la viabilidad celular a las 4 h de exposición; sin embargo, a las 12 y 24 h la viabilidad fue similar a la presentada por el control (datos no mostrados).

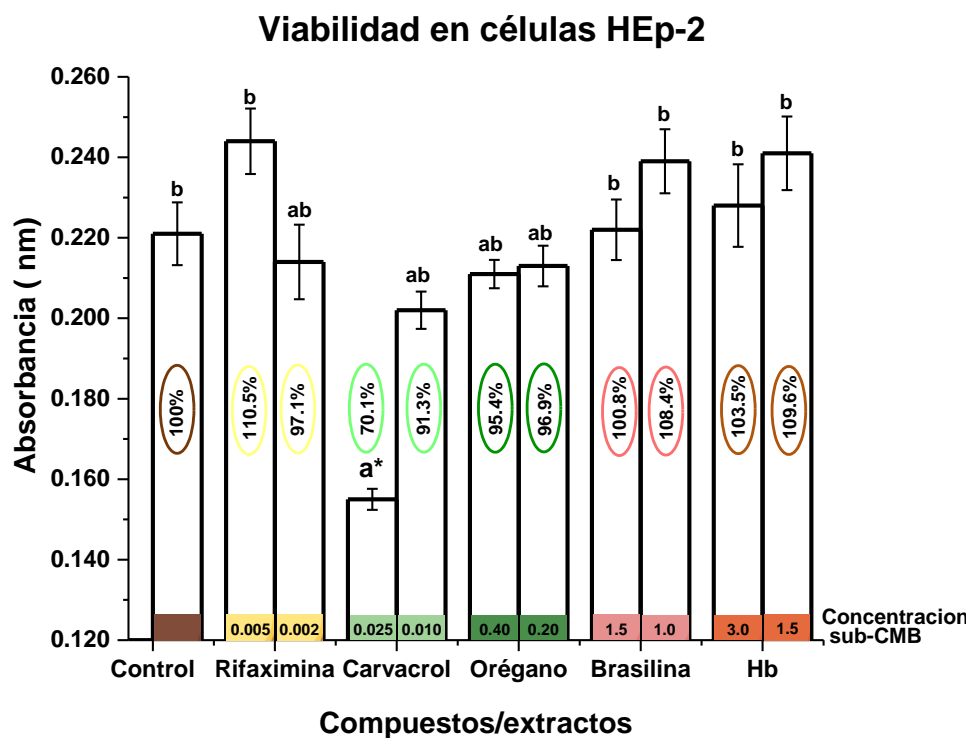


Figura 16. Porcentaje de viabilidad de células HEp-2 realizada después de 4 h de exposición a sub-CMB de antimicrobianos por el método MTT.

a) Los antimicrobianos afectan la capacidad de unión de *E. coli* y en menor grado de células HEp-2.

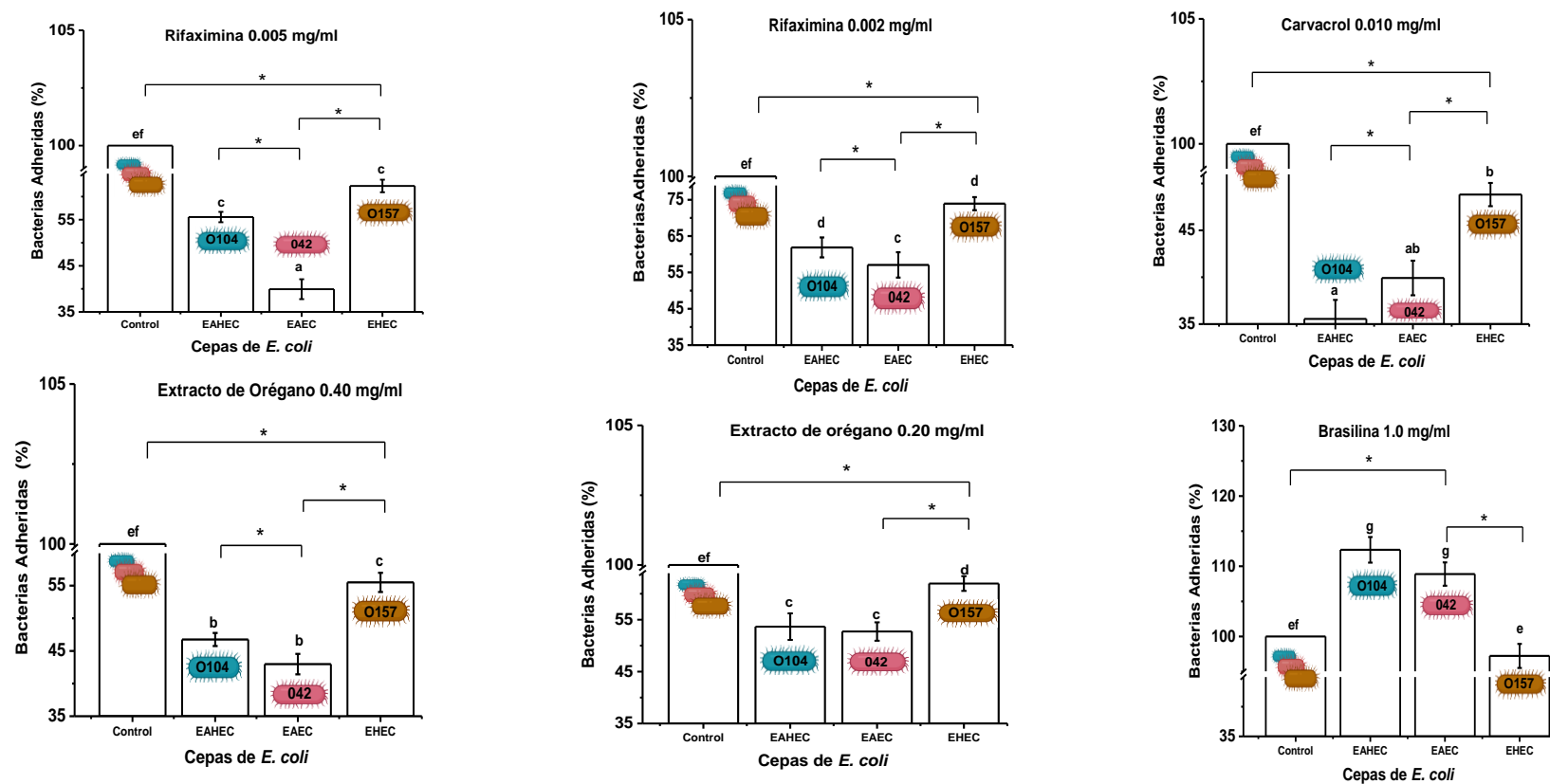
La exposición de *E. coli* a concentraciones sub-CMB de rifaximina, extracto de orégano y carvacrol durante 4 h (1h de pre-incubación y tres horas en el ensayo de adhesión en la línea celular HEp-2) y en pequeñas concentraciones en células HEp-2, mostró inhibición de la adhesión. Los patotipos estudiados en general redujeron su capacidad de adherirse a la célula HEp-2 (Figura 17), desde 26.1% ( $P \leq 0.05$ ) en EHEC O157:H7 en presencia de 0.002 mg/ml de rifaximina, hasta 64.5% ( $P \leq 0.05$ ) en EHAEC O104:H4 tratada con 0.010 mg/ml carvacrol, siendo este último el serotipo más afectado. En todos los tratamientos se observó dosis dependencia.

En contraste, en la tabla 5 se puede observar que el uso de concentraciones sub-CMB de Hb y brasilina incrementaron la capacidad de adhesión *E. coli*-HEp-2, alcanzando hasta 112.34% ( $P \leq 0.05$  en EHAEC O104:H4 en presencia de 1.0 mg/ml de brasilina, el mismo comportamiento fue observado en el serotipo 042 Chile con  $\leq 108.89\%$  ( $P \leq 0.05$ ),

sugiriendo que probablemente algunos de los mecanismos fisiológicos dispuestos para la adhesión agregativa estén sobre-estimulados, ya que EHEC O157:H7 no mostró variaciones con respecto al control. Debido a los resultados tan diferentes a las intenciones de esta investigación no se incluyó el uso de estos antimicrobianos en ensayos posteriores.

Se concluye que rifaximina, carvacrol y extracto de orégano en concentraciones sub-CMB son eficientes inhibiendo la capacidad de adhesión en *E. coli* y en HEp-2, probablemente exista una acción de bloqueo de factores de virulencia generales relacionados a la adhesión de este microorganismo (adhesinas, fimbrias, entre otros) evitando de ese modo que se desarrolle la etapa inicial de la adhesión, en la cual pueden además, estar bloqueados receptores de membrana en HEp-2.

Figura 17. Porcentaje de bacterias de *E. coli* unidas a células HEp-2 después de la preincubación de *E. coli* con antimicrobianos por 1 h. Alícuotas se usaron para infectar células HEp-2, y después de 3 h se determinaron las bacterias adheridas.



Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere del control. (\*) Significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Tabla 5. Porcentaje de células de *E. coli* adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. Las bacterias se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEp-2. Después de 3 h se determinaron las bacterias adheridas a la línea celular.

<b>log<sub>10</sub> Número de bacterias adheridas a células HEp-2 (% de adhesión)</b>											
Serotype	Control	Rifaximina		Carvacrol		Extracto de orégano extract		Brasilina		Hb	
		0.005	0.002	0.025	0.010	0.40	0.20	1.5	1.0	3.0	1.5
EAHEC	8.81 ±0.13	4.89 ±0.14	5.45 ±0.27	Concentración citotóxica para HEp-2	3.13 ±0.17	4.11 ±0.06	4.72 ±0.28	9.20 ±0.27	9.89 ±0.10	9.84 ±0.22	9.63 ±0.49
O104:H4	(100)e	(55.57)c*	(61.88)d*		(35.55)a*	(46.75)b*	(53.66)c*	(104.56)f*	(112.34)g*	(111.75)g*	(109.42)g*
EAEC	7.50 ±0.12	2.85 ±0.15	4.28 ±0.27		2.99 ±0.13	3.23 ±0.10	3.95 ±0.08	7.82 ±0.61	8.17 ±0.50	7.94 ±0.52	7.46 ±0.48
042 Chile	(100)e	(37.93) a*	(57.07)c*		(39.92)ab*	(42.98)b*	(52.72)c*	(104.25)ef	(108.89)f*	(105.84)ef	(99.44)d
EHEC	7.95 ±0.08	4.95 ±0.07	5.88 ±0.14		3.87 ±0.10	4.41 ±0.09	5.01 ±0.12	7.78 ±0.08	7.73 ±0.15	8.16 ±0.06	8.23 ±0.17
O157:H7	(100)f	(62.31)c*	(73.92)d*		(48.82)a*	(55.50)c*	(62.96)d*	(97.87)f	(97.23)e*	(102.68)g*	(103.52)g*

±: Desviación Estándar.

Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere ( $P \leq 0.05$ ) del control.

*b) Los antimicrobianos afectan la capacidad únicamente de E. coli para unirse las células HEp-2.*

Para conocer si la respuesta observada era únicamente sobre *E. coli*, se evaluó la actividad de los compuestos/extractos sobre la capacidad de adhesión de esta bacteria (en dos medios de cultivo). Para esto, se pre-incubó la bacteria en MEM y caldo Müeller Hinton conteniendo concentraciones sub-CMB de los antimicrobianos. Después de 1 h, el cultivo se lavó con PBS, centrifugó y resuspendió en MEM; 200 µl se utilizaron para infectar las células HEp-2 durante 3 horas.

El resultado no mostró diferencias en la capacidad de adhesión de *E. coli* (Tabla 6) utilizando los dos medios de cultivo, pero se mantenía la tendencia inhibitoria, pero con valores más discretos que el ensayo anterior, correspondiendo la mayor inhibición de adhesión el 23.5% ( $P \leq 0.05$ ) por EHEC O157:H7 tratada con 0.025 mg/ml de carvacrol.

Concluyendo que las concentraciones sub-CMB de rifaximina, carvacrol y extracto de orégano, actúan sobre la capacidad de adhesión de *E. coli* manifestando una relación directamente proporcional entre el tiempo de exposición y la respuesta de inhibición, siendo evidente que la presencia de los antimicrobianos en la etapa inicial de la adhesión determina la capacidad adherente de *E. coli* independientemente del medio de cultivo donde crece el microorganismo.



Tabla 6. Porcentaje de células de *E. coli* adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. Las bacterias crecieron en dos medios diferentes y se agregaron antimicrobianos, después de 1 h los medios se descartaron y las células de *E. coli* se suspendieron en medio MEM nuevo y se usaron para infectar monocapas de HEp-2. Después de 3 h se determinaron las células de *E. coli* adheridas.

log 10 Número de bacterias adheridas a células HEp-2 (% de adhesión)											
<i>E. coli</i> Serotype	Antimicrobianos (mg/ml)										
	Control	Rifaximin		Carvacrol		Oregano extract		Brazilin		Hb	
		0.005	0.002	0.025	0.010	0.40	0.20	1.5	1.0	3.0	1.5
<i>E. coli</i> crecida en MEM											
EAHEC	8.72 ±0.18	6.88 ±0.05	7.90 ±0.06	7.05 ±0.31	7.73 ±0.36	7.28 ±0.32	7.47 ±0.62	8.89 ±0.55	9.05 ±0.51	8.89 ±0.52	9.07 ±0.09
O104:H4	(100)d	(78.91)a*	(90.67)c*	(80.22)ab*	(88.66)c*	(83.49)ab*	(85.77)bc*	(101.91)d	(103.82)d	(101.98)d	(104.09)d
EAEC	7.42 ±0.13	5.71 ±0.08	6.59 ±0.40	5.75 ±0.17	6.52 ±0.21	6.82 ±0.07	6.84 ±0.09	7.80 ±0.40	7.44 ±0.33	7.63 ±0.27	7.52 ±0.46
042 Chile	(100)e	(76.88)a*	(88.72)bc*	(77.59)a*	(87.79)b*	(91.87)c*	(92.27)c*	(105.09)f*	(100.24)e	(102.82)ef	(101.27)ef
EHEC	8.02 ±0.54	7.26 ±0.50	8.01 ±0.50	6.13 ±0.56	6.64 ±0.57	6.56 ±0.41	6.76 ±0.74	8.13 ±0.56	8.38 ±0.44	8.04 ±0.51	8.15 ±0.21
O157:H7	(100)d	(90.72)c*	(99.85)d	(76.48)a*	(84.26)b*	(82.90)b*	(85.06)b*	(101.48)d	(104.67)e*	(100.93)d	(101.65)d
<i>E. coli</i> crecida en caldo Mueller Hinton											
EAHEC	8.87 ±0.20	6.81 ±0.19	7.86 ±0.17	6.94 ±0.10	7.79 ±0.36	7.25 ±0.09	7.53 ±0.51	8.78 ±0.30	8.94 ±0.26	8.85 ±0.50	9.06 ±0.36
O104:H4	(100)d	(78.13)a*	(90.15)c*	(79.64)a*	(89.35)c*	(83.30)ab*	(86.47)bc*	(100.68)d	(102.58)d	(101.47)d	(103.96)d
EAEC	7.56 ±0.34	5.84 ±0.26	6.57 ±0.19	5.76 ±0.18	6.63 ±0.20	6.86 ±0.25	7.03 ±0.14	7.81 ±0.21	7.69 ±0.14	7.58 ±0.34	7.72 ±0.17
042 Chile	(100)e	(78.65)a*	(88.47)b*	(77.68)a*	(89.35)bc*	(92.43)cd*	(94.82)d*	(105.22)f	(103.62)f	(102.12)ef	(104.09)f
EHEC	7.92 ±0.45	7.23 ±0.51	8.16 ±0.46	6.22 ±0.42	6.57 ±0.47	6.63 ±0.33	6.69 ±0.26	8.11 ±0.23	8.25 ±0.39	8.14 ±0.42	8.01 ±0.21
O157:H7	(100)d	(90.17)c*	(101.87)d	(77.53)a*	(82.01)ab*	(82.68)ab*	(83.69)b*	(101.87)d	(102.95)d	(101.65)d	(100.17)d

±: Desviación Estándar. Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere del control. (\*) Significancia estadística (P≤0.05).

c) Los antimicrobianos actúan solo sobre las células HEp-2.

Sin embargo, para determinar si los antimicrobianos bloquean únicamente en las células HEp-2 la capacidad de adhesión bacteriana, fue necesario exponer las células eucarióticas a concentraciones sub-CMB de antimicrobianos, por 1 h, y posteriormente agregar las bacterias.

Interesantemente, se determinó de forma global que las bacterias adheridas no se disminuyeron, sino que se mantuvieron entre 99.16% y 101.44%, (Tabla 7), muy similar al control, lo que indicó que las células HEp-2 no juegan un papel importante en la acción de los antimicrobianos para bloquear la adhesión bacteriana, por lo que concluimos que la inhibición de la adhesión se basa principalmente en la alteración de factores de virulencia bacterianos relacionados a la adhesión, y no así en el bloqueo de los sitios de unión en la membrana de las células HEp-2.

Tabla 7. Porcentaje de células de *E. coli* adheridas a células HEp-2 por exposición a antimicrobianos. En este ensayo, monocapas confluentes de células HEp-2 se preincubaron con los antimicrobianos y se incubaron por 1 h: se eliminó el medio y la línea celular fue infectada con *E. coli*. Después de 3 h se determinaron las células de *E. coli* adheridas.

Serotipo	log 10 Número de bacterias adheridas a células HEp-2 (% de adhesión)					
	Control	Rifaximina		Carvacrol	Extracto de orégano	
		0.005	0.002	0.010	0.40	0.20
EAHEC	8.91 ±0.09	8.89 ±0.06	8.97 ±0.34	8.66 ±0.14	8.87 ±0.07	8.94 ±0.33
O104:H4	(100)b	(99.66)b	(100.62)bc	(97.16)a*	(99.52)b	(100.32)bc
EAEC	7.67 ±0.08	7.80 ±0.15	7.97 ±0.41	7.64 ±0.13	7.86 ±0.06	7.87 ±0.06
O42 Chile	(100)a	(101.63)abc	(103.89)d*	(99.63)a	(102.40)bcd	(102.61)bcd
EHEC	8.05 ±0.05	7.89 ±0.12	8.53 ±0.08	8.06 ±0.10	8.00 ±0.26	8.17 ±0.08
O157:H7	(100)bc	(97.99)a	(105.84)d*	(100.02)bc	(99.31)ab	(101.44)c

±: Desviación Estándar. Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere del control. (\*) Significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

d) Los antimicrobianos pueden desprender las bacterias unidas a células HEp-2.

Para conocer si los antimicrobianos podían facilitar la separación de células bacterianas ya unidas a HEp-2. Después de 1 h de contacto bacteria-HEp-2 se retiraron las bacterias no adheridas y se agregaron los antimicrobianos por 3 h. Los resultados mostraron que los antimicrobianos no afectaron el total de bacterias adheridas a células HEp-2 (Tabla 8); la mayor reducción se observó en EHAEC O104:H4 (4.71%) tratada con 0.005 mg/ml de rifaximina, permitiéndonos concluir que los antimicrobianos en las concentraciones utilizadas no fueron eficientes para revertir la unión *E. coli*-HEp-2 una vez establecida.

Tabla 8. Capacidad de sub-CMB (mg/ml) de antimicrobianos para separar células de *E. coli* unidas a HEp-2. Las bacterias infectaron monocapas de HEp-2 durante 1 h, se retiraron las bacterias no adheridas y se añadieron los antimicrobianos por 3 h. Se determinó el porcentaje (%) de bacterias adheridas.

log <sub>10</sub> Número de bacterias adheridas a células HEp-2 (% de adhesión)						
Serotipo	Control	% de bacterias adheridas				
		Rifaximina	Carvacrol		Extracto de Orégano	
		0.005	0.002	0.010	0.40	0.20
EAHEC	7.36 ±0.26	7.01 ±0.10	7.16 ±0.10	7.31 ±0.05	7.10 ±0.13	7.33 ±0.19
O104:H4	(100)b	(95.29)ab	(97.45)ab	(99.48)b	(96.72)ab	(99.83)b
EAEC	6.05 ±0.90	5.96 ±0.34	6.02 ±0.13	5.97 ±0.16	6.11 ±0.12	6.14 ±0.17
042 Chile	(100)a	(98.56)a	(99.44)a	(98.68)a	(100.79)a	(101.44)a
EHEC	6.69 ±0.12	6.45 ±0.36	6.49 ±0.32	6.65 ±0.39	6.53 ±0.34	6.50 ±0.30
O157:H7	(100)a	(96.43)a	(97.06)a	(99.35)a	(97.59)a	(97.27)a

±: Desviación Estándar. Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere ( $P \leq 0.05$ ) del control.

En general, la actividad de estos antimicrobianos mostró potencial para inhibir la adhesión de *E. coli* a células HEp-2, pero no para revertir el proceso una vez desarrollado.

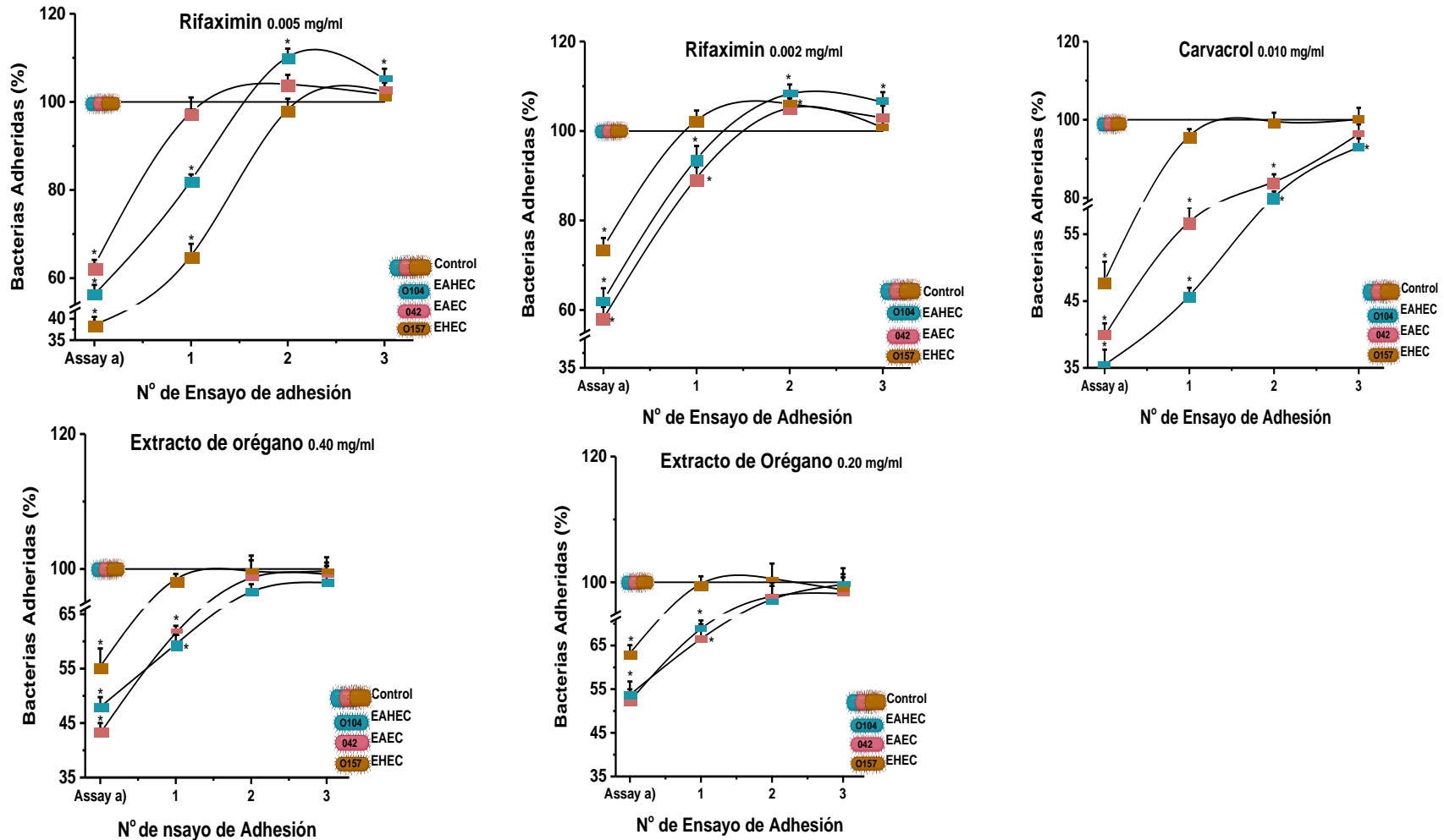
*e) Las bacterias no adheridas expuestas a antimicrobianos pueden mantener memoria de no-adhesión.*

Para conocer el comportamiento adherente, de las bacterias no adheridas pero expuestas a antimicrobianos se colectaron células expuestas a los sobrenadantes pero que no se habían adherido a las células eucarióticas. El procedimiento se repitió en 3 ocasiones, colectando las células no adheridas y agregándolas a nuevas monocapas de células HEp-2. Los resultados demostraron, que en las bacterias enteroagregativas (EAEC y EHAEC) tratadas con carvacrol y extracto de orégano, se unieron menos a la línea celular (Figura 18); en el caso de EHAEC O104:H4 el carvacrol al 0.1 mg/ml inhibieron la adhesión ( $P \leq 0.05$ ) en 54.2, 19.8 y 7.1% en el primer, segundo y tercer ciclo de ensayos respectivamente y este mismo efecto se observó en EAEC 042. En contraste, EHEC O157:H7 tratada con carvacrol solo mostró una inhibición discreta en el 1er ciclo, para alcanzar valores similares al control en los ciclos subsecuentes.

Las bacterias no adheridas tratadas con rifaximina, incrementaron la adhesión a las células HEp-2, en los 3 serotipos evaluados (Tabla 9). En este caso, el cultivo de EAHEC no adherido procedente del ensayo a) tratado con rifaximina, manifestó en el primer ciclo un aumento del número de bacterias adheridas de 25% y 31% ( $P \leq 0.05$ ) para 0.005 y 0.002 mg/ml, respectivamente, duplicando la tasa de recuperación con respecto al mismo ciclo en las tratadas con carvacrol y extracto de orégano, pero lo más interesante resultó ser la hiperadherencia que manifestó este serotipo ( $\leq 10.27\%$ ,  $P \leq 0.05$ ) en el último ciclo evaluado, probablemente debido al mecanismo de acción diferente de la rifaximina con respecto a los otros antimicrobianos. *E. coli* 042 manifestó la misma tendencia de recuperación mostrando al final  $\leq 5.13\%$  más de bacterias adheridas con respecto al control. Por otro lado, el serotipo O157:H7 alcanzó valores similares al control en los 3 ciclos evaluados.

Se concluye que el carvacrol y el extracto de orégano bloquean de alguna manera en bacterias agregativas no adheridas algun(os) factores relacionados a adhesión, pero es dependiente del tiempo.

Figura 18. Porcentaje de células de *E. coli* adheridas a HEP-2. Las células de *E. coli* fueron expuestas a antimicrobianos y a la línea celular. Las células que no se adherieron fueron recolectadas y se pusieron en contacto con nuevas monocapas no tratadas de células HEP-2 y se midió el % de adhesión. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones.



Las letras diferentes indican un número de bacterias adheridas que difiere del control. (\*) Significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ).

Tabla 9. Determinación de la capacidad de memoria de *E. coli* para inhibir la adhesión a células HEp-2, por bacterias previamente expuestas a antimicrobianos, pero no adheridas a la línea celular. Las bacterias expuestas, pero no adheridas a las células HEp-2, fueron recolectadas y utilizadas para infectar monocapas de células HEp-2 por tres períodos consecutivos. Las células de *E. coli* adheridas se determinaron por recuento en placa.

log <sub>10</sub> Número de bacterias adheridas a células HEp-2 (% de adhesión)							
Serotipo	Período de adhesión	Control	Rifaximina		Carvacrol	Extracto de orégano	
			0.005	0.002	0.010	0.40	0.20
EAHEC	Experimento	8.72 ±0.18	4.91 ±0.13	5.41 ±0.31	3.10 ±0.18	4.18 ±0.04	4.68 ±0.29
O104:H4	a)	(100)e	(56.30)c*	(62.14)d*	(35.48)a*	(47.97)b*	(53.71)c*
	1 <sup>st</sup>	8.74 ±0.13	7.15 ±0.25	8.16 ±0.50	3.99 ±0.12	5.19 ±0.08	5.79 ±0.32
		(100)f	(82.18)d*	(93.75)e*	(45.81)a*	(59.47)b*	(66.51)c*
	2 <sup>nd</sup>	8.71 ±0.37	9.60 ±0.14	9.43 ±0.11	7.00 ±0.10	8.42 ±0.35	8.47 ±0.37
		(100)b	(110.19)c*	(108.27)c*	(80.22)a*	(96.63)b	(97.27)b
	3 <sup>rd</sup>	8.86 ±0.29	9.12 ±0.10	9.06 ±0.52	8.05 ±0.08	8.46 ±0.30	8.49 ±0.25
		(100)b	(105.15)bc	(106.45)c*	(92.95)a*	(97.98)b	(99.65)b
EAEC	Experimento	7.56 ±0.29	2.91 ±0.10	4.38 ±0.41	3.01 ±0.07	3.26 ±0.08	3.94 ±0.36
042 Chile	a)	(100)e	(38.59)a*	(58.10)d*	(39.83)ab*	(43.14)b*	(52.30)c*
	1 <sup>st</sup>	7.44 ±0.24	4.92 ±0.09	6.75 ±0.32	4.29 ±0.30	4.63 ±0.16	5.27 ±0.06
		(100)f	(65.13)c*	(89.53)e*	(56.85)a*	(61.54)b*	(69.83)d*
	2 <sup>nd</sup>	7.49 ±0.21	7.40 ±0.15	7.93 ±0.09	6.34 ±0.41	7.45 ±0.10	7.37 ±0.01
		(100)b	(98.23)b	(105.13)bc	(84.11)a*	(98.67)b	(97.74)b
	3 <sup>rd</sup>	7.52 ±0.33	7.73 ±0.17	7.60 ±0.20	7.27 ±0.08	7.48 ±0.11	7.40 ±0.31
		(100)ab	(102.34)b	(100.75)b	(96.33)a	(99.21)ab	(98.19)ab
EHEC	Experimento	7.90 ±0.23	4.96 ±0.07	5.84 ±0.06	3.79 ±0.15	4.37 ±0.32	4.99 ±0.20
O157:H7	a)	(100)e	(62.85)c*	(74.02)d*	(48.07)a*	(55.40)b*	(63.22)c*
	1 <sup>st</sup>	7.89 ±0.13	7.71 ±0.12	8.01 ±0.18	7.56 ±0.22	7.78 ±0.24	7.89 ±0.14
		(100)bc	(97.61)ab	(101.36)bc	(95.84)a*	(98.49)b	(99.75)bc
	2 <sup>nd</sup>	7.97 ±0.10	8.24 ±0.16	8.35 ±0.21	7.86 ±0.15	7.90 ±0.40	7.93 ±0.32
		(100)a	(104.01)b*	(106.06)b*	(99.56)a	(99.69)a	(100.58)a
	3 <sup>rd</sup>	8.01 ±0.08	8.00 ±0.06	8.04 ±0.38	7.96 ±0.09	7.83 ±0.23	7.85 ±0.11
		(100)a	(101.67)a	(102.97)a	(100.12)a	(99.70)a	(98.80)a

±: Desviación Estándar. Las letras difieren indican que el porciento de bacterias adheridas difiere del control. (\*)

Significancia estadística (P≤0.05).

### 9.3. Análisis del patrón de adhesión.

Se realizó por tinción de Giemsa y se visualizó por microscopía de luz a 40X las características de adherencia de EAHEC O104:H4 expuesta a los antimicrobianos (Fig 19). Se observó en EHAEC O104:H4 una estructura en forma de ladrillos apilados (Fig 19A), sin embargo, la exposición a carvacrol (10 mg/ml, Fig. 19B, Tabla 10), modificó este patrón provocando adherencia bacteriana totalmente aleatoria, separando las bacterias, semejando un patrón de adherencia difusa (AD). La exposición a rifaximina y extracto de orégano (Fig. 19C y 19D respectivamente) alteraron también el patrón de adhesión característico, sin embargo, las bacterias se observaron con tendencia a mantenerse unidas.

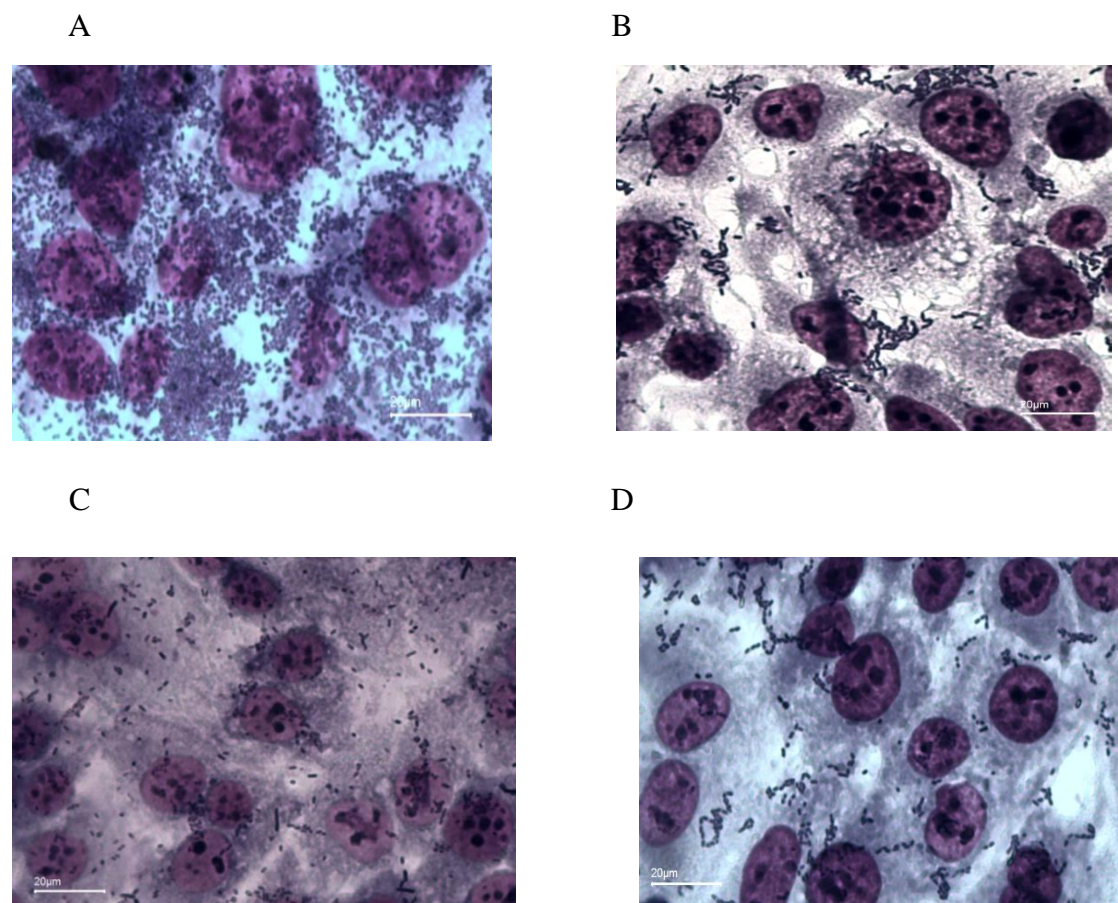


Figura 19. Patrón de adhesión por *E. coli* O104:H4 por efecto de preincubación con antimicrobianos. Las células se lavaron y se tiñeron con Giemsa. (A) Control. Bacterias tratadas con: (B) rifaximina 0.005 mg / ml, (C) carvacrol 0.010 mg / ml y, (D) orégano 0.040 mg / ml.

Tabla 10. Número de bacterias y agregados bacterianos por campo en muestras teñidas por Giemsa posterior al ensayo de adhesión a).

Tratamiento	(mg/ml)	Cuenta por campo ( $\bar{x}$ )	
		Bacterias adheridas (sola)	Bacterias adheridas (agregados)
Control		52 $\pm$ 9.61	5 $\pm$ 1.84 +++ 27 $\pm$ 4.35 ++ 32 $\pm$ 3.69 +
Rifaximina	0.005	22 $\pm$ 6.31	18 $\pm$ 2.35 ++ 7 $\pm$ 2.01 +
Carvacrol	0.10	158 $\pm$ 10.77	2 $\pm$ 0.84 ++ 5 $\pm$ 1.29 +
Extracto de orégano	0.40	41 $\pm$ 7.12	23 $\pm$ 3.16 ++ 12 $\pm$ 2.81 +

Agregados bacterianos formados por  $\leq 10$  bacterias (+), entre 10 y 50 bacterias (++),  $\geq 50$  bacterias (+++).

#### 9.4. Análisis de expresión génica.

##### a) Bacterias adheridas

Aunque los serotipos de *E. coli* en estudio se caracterizan por ser adherentes, conocer la expresión genotípica de las bacterias adheridas a las células HEP-2 resultaba interesante para esclarecer posibles mecanismos de acción. De ese modo se determinó por qPCR sobreexpresión en algunos genes que probablemente incrementaron la capacidad de adhesión en *E. coli*. En las bacterias agregativas se observó que al menos 1 de los cuatro genes evaluados se sobre expresó en la mayoría de los tratamientos (Tabla 11), en el caso de EHAEC O104:H4 tratada con ambas concentraciones de rifaximina, los genes *aggR* (activador transcripcional en pAA), *pic* (autotransportador de serina en *Enterobacteriaceae*), *aggA* (AAF) and *aap* (dispersina) fueron sobreexpresados; en contraste EAEC 042, solo mostró sobreexpresión de *pic* en presencia de la concentración más baja de rifaximina, lo que indicó que existen otros genes que facilitan la inhibición de la adhesión bacteriana a células HEP-2.

La alteración del patrón de agregación de EHAEC O104:H4 en presencia de carvacrol puede haberse debido por combinaciones de genes expresados, pues es el único caso en que se disminuyó la expresión de *aggR*, *pic* y *aap*, y se sobre expresó *aggA* (1.95 veces), provocando la adhesión a través de la fimbria de adherencia agregativa, pero combinado con un efecto de anti-agregación provocado por la reducción de *aap*, tal como se observó bajo microscopio. Este efecto no fue observado en EAEC 042, probablemente por la sobreexpresión de *aggR* y *pic*.



La expresión del fago de *stx2a* se manifestó reprimida en todos los tratamientos evaluados, excepto en las bacterias adheridas tratadas con extracto de orégano a 0.40 mg/ml, donde el serotipo O157:H7 aumentó en 1.56 ( $P \leq 0.05$ ) veces su expresión, evidenciándose una importante dosis dependencia, porque en contraste, la concentración más baja reprimió este gen en las bacterias adheridas de los dos serotipos evaluados.

El gen que codifica para la proteína intimina (*eae*), adhesina presente en EHEC O1057:H7, se mantuvo sobre-expresado en presencia de rifaximina y 0.40 mg/ml de extracto de orégano, sugiriendo en este caso ampliar el rango de genes a evaluar para profundizar en el efecto inhibitorio de estos compuestos en bacterias con adherencia focalizada. Podemos concluir que la rifaximina, carvacrol y extracto de orégano modularon la actividad genotípica de manera dosis dependiente, con una marcada diferencia en la respuesta observada en los serotipos agregativos.

#### *b) Bacterias no adheridas*

Las bacterias no adheridas pero expuestas a antimicrobianos presentaron un patrón de expresión génica inconsistente (Tabla 11). En este caso EHAEC O104:H4 fue subexpresada ( $P \leq 0.05$ ), en *aggA* tratada con 0.002 y 0.10 mg/ml de rifaximina y carvacrol, respectivamente, en tanto que el resto de los genes (*aggR*, *pic* y *aap*) fueron sobre-expresados ( $P \leq 0.05$ ). De igual modo, *E. coli* 042 sobre-expresó en la mayoría de los tratamientos los genes *aggR* y *pic*, con excepción de aquellas tratadas con rifaximina. Interesantemente, la expresión de *aggA* y *aap* fue inhibida para este serotipo en todos los casos evaluados. Los datos obtenidos sugieren varias causas para explicar porque persiste la alteración en el comportamiento adherente de los serotipos agregativos: la reducción en la expresión de *aggA* y/o *aap*, provocando afectaciones en las FAA (adherise) y la dispersina (autoagregarse), posibles efectos sobre diferentes proteínas, si tenemos en cuenta el caso de sobre-expresión del activador transcripcional (*aggR*) de *aggA* y *aap* los cuales en contraste, están reprimidos.

El gen *stx2a* reprimió su expresión a causa de la presencia de carvacrol, sin embargo, a diferencia de las bacterias adheridas ambas concentraciones sub-CMB de extracto de orégano sobre-expresaron la actividad de este gen, causando de 0.40 mg/ml un considerable aumento de 4.9 y 2.2 ( $P \leq 0.05$ ) veces en la expresión de *stx* en *E. coli* O104: H4 y O157: H7, respectivamente, sugiriendo que la combinación de varios principios activos en un mismo compuesto probablemente favorece el incremento de la producción de Stx2a, con mayor estímulo sobre el serotipo híbrido, donde además se encontró un aumento de 0.77 ( $P \leq 0.05$ ) veces de expresión para este gen, en presencia de 0.005 mg/ml de rifaximina.

La cepa EHEC O157:H7 presentó tendencias similares en la expresión de *eae* a las bacterias adheridas, lo que probablemente fue la causa de la rápida recuperación en la capacidad de adhesión de este patotipo, indicando, además, que otros genes no evaluados pudieran estar interfiriendo para limitar el desarrollo de este proceso. Se concluyó que las concentraciones sub-CMB de antimicrobianos alteran el comportamiento adherente de bacterias agregativas no adheridas, modificando su expresión génica.

Tabla 11. Sobre-expresión o represión de genes de *E. coli* relacionados a la adhesión por efecto de exposición a antimicrobianos. La bacteria se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEp-2. Después de 3 h se midió su expresión.

Sobre-expresión o represión de genes en Bacterias adheridas (no- adheridas)						
Gen	Serotipo de <i>E. coli</i>	Rifaximina		Carvacrol	Extracto de Orégano	
		0.005 mg/ml	0.002 mg/ml	0.010 mg/ml	0.40 mg/ml	0.20 mg/ml
<i>aggR</i>	EAEC 042	0.008 ±0.01a* (2.5 ±0.29d*)	0.26 ±0.27b* (0.5 ±0.42b*)	50 ±0.04g* (4.6 ±0.28e*)	2.2 ±0.01d* (2.7 ±0.03d*)	2.6 ±0.05e* (10 ±0.01f*)
	EAHEC O104:H4	7.7 ±0.66e* (75 ±0.82g*)	6.4 ±0.16e* (1.1 ±0.09c)	0.3 ±0.06b* (1.7 ±0.39d*)	0.6 ±0.46 b* (7.1 ±0.32e*)	1.6 ±0.67d* (5.3 ±0.34e*)
<i>pic</i>	EAEC 042	0.6 ±0.09b* (0.4 ±0.03b*)	38 ±0.01f* (0.1 ±0.18a*)	31 ±0.05f* (16 ±0.04f*)	0.07 ±0.05a* (2.1 ±0.02d*)	0.09 ±0.25a* (2.8 ±0.04e*)
	EAHEC O104:H4	5.0 ±0.02e* (174 ±0.50g*)	29 ±0.23f* (1.3 ±0.07c)	0.04 ±0.03a* (1.2 ±0.53c)	0.06 ±0.21a* (0.4 ±0.08b*)	0.10 ±0.01a* (0.37 ±0.07b*)
<i>aggA</i>	EAEC 042	0.002 ±0.0a* (0.09 ±0.0a*)	0.004 ±0.0a* (0.01 ±0.01a*)	0.001 ±0.0a* (0.04 ±0.0a*)	0.01 ±0.0a* (0.02 ±0.0a*)	0.58 ±0.0b* (0.20 ±0.01a*)
	EAHEC O104:H4	2.32 ±0.04d* (1.20 ±0.1c)	2.66 ±0.03e* (0.02 ±0.01a*)	2.95 ±0.12e* (0.70 ±0.03b*)	3.0 ±0.05 (1.85 ±0.12d*)	0.83 ±0.01c (0.26±0.07a*)
<i>aap</i>	EAEC 042	0.05 ±0.0a* (0.004 ±0.0a*)	0.026 ±0.0a* (0.032 ±0.0a*)	0.05a* ±0.0 (0.002 ±0.0a*)	0.04 ±0.0a* (0.018 ±0.0a*)	0.04 ±0.0a* (0.001 ±0.0a*)
	EAHEC O104:H4	0.68 ±0.23b* (2.01 ±0.03d*)	4.17 ±0.11e* (1.03 ±0.01c)	0.16 ±0.09a* (1.97 ±0.05d*)	2.55 ±0.17d* (3.02 ±0.05e*)	0.15 ±0.01a* (0.99 ±0.03c)
<i>stx2a</i>	EAHEC O104:H4	0.41 ±0.07b* (1.77 ±0.21d*)	0.45 ±0.02b* (0.12 ±0.01a*)	0.85 ±0.14c (0.89 ±0.03c)	1.29 ±0.13c (5.89 ±0.18e*)	0.74 ±0.03b* (1.13 ±0.22c)
	EHEC O157:H7	0.48 ±0.11b* (0.45 ±0.0)	1.16 ±0.01c (0.56 ±0.08b*)	0.38 ±0.07b* (0.43 ±0.0)	2.56 ±0.19d* (3.2 ±0.27e*)	0.70 ±0.09b* (2.1 ±0.0)
<i>eae</i>	EHEC O157:H7	3.9 ±0.04e* (4.1 ±0.48e*)	2.3 ±0.03d* (0.05 ±0.26a*)	0.8 ±0.02c (0.1±0.01a*)	5.7 ±0.5e* (4.1±0.3e*)	0.72 ±0.4b* (0.81 ±0.01c)

±: Desviación Estándar. Diferentes letras indican un número de expresión génica que difiere del control, analizando las categorías adheridas y no adheridas individualmente. El grupo control se normalizó con el valor 1, (subconjunto poblacional c), indicando los valores >1 sobre-expresión y < 1 represión de los genes evaluados. (\*) Significancia estadística (P≤0.05).

### ***9.5. Análisis de expresión de genes. Genes de estrés oxidativo en HEp-2.***

Con el objetivo de conocer si los antimicrobianos afectaban procesos vitales en células HEp-2 se analizó la expresión de genes que codifican para enzimas del estrés oxidativo superóxido, la dismutasa 1 (SD1, localizada en el citoplasma), superóxido dismutasa 2 (SD2, localizada en la mitocondria), catalasa y glutatión peroxidasa.

Los resultados indicaron que las células HEp-2 tratadas con EHAEC O104:H4 y/o antimicrobianos, sobre-expresaron hasta 1.12 al gen SOD1, en todos los casos evaluados; este mismo efecto fue observado para el gen SO2 cuando se expuso a rifaximina y extracto de orégano (Tabla 12). Algo semejante ocurrió cuando las células HEp-2 fueron tratadas con la cepa EAEC 042 y/o antimicrobianos, en donde ocurrió sobre-expresión hasta 1.62 veces para SO1, con excepción de extracto de orégano (0.40 mg/ml) donde no se modificó la expresión génica. El tratamiento con rifaximina sobre-expresó el gen SD2 hasta 1.89 veces. La exposición de las células eucarióticas a las cepas agregativas provocó la sub-expresión de los genes que codifican para catalasa y glutatión peroxidasa, aunque este último fue sobre-expresado en EAEC 042. Con la discreta sobre-expresión detectada en ambos niveles de SOD podemos concluir que ocurre la alteración de la dinámica mitocondrial como una respuesta de defensa a la presencia de bacterias y/o antimicrobianos en un período de 3 h.

Tabla 12. Sobre-expresión o represión de genes de células HEP-2 relacionados con el estrés oxidativo por efecto de exposición a antimicrobianos. La bacteria se pre-incubaron con los antimicrobianos por 1 h, y posteriormente infectaron células HEP-2. Después de 3 h se realizó la determinación.

Gen	Exposición de HEP-2 a:	Control (Hep-2 & bacterias)	Antimicrobianos (mg/ml)				
			Rifaximina	Carvacrol	Extracto de oregano		
			0.005	0.002	0.010	0.40	0.20
<i>SOD 1</i>	Solo AM		1.11 ±0.05c	0.91 ±0.01c	1.13 ±0.15c	0.49 ±0.09b*	1.57 ±0.06d*
	AM + EAEC	0.79 ±0.04c	2.62 ±0.03e*	1.53 ±0.15d*	1.23 ±0.09c	0.94 ±0.12c	1.61 ±0.10d*
	AM + EAHEC	1.47 ±0.02d*	2.12 ±0.04e*	1.37 ±0.06d*	1.20 ±0.01c	1.77 ±0.04d*	1.31 ±0.01d*
<i>SOD 2</i>	Solo AM		1.14 ±0.05c	0.74 ±0.12c	1.24±0.02c	0.96 ±0.01c	1.41 ±0.08d*
	AM + EAEC	0.26 ±0.02a*	2.89 ±0.04e*	1.35 ±0.13d*	0.29 ±0.01a*	0.60 ±0.15b*	1.05 ±0.02c
	AM + EAHEC	0.95 ±0.03c	2.8 ±0.02e*	0.83 ±0.07c	0.79 ±0.12c	1.43 ±0.09d*	0.45 ±0.11a*
<i>CAT</i>	Solo AM		0.69 ±0.04b*	0.96 ±0.09c	0.68 ±0.01b*	1.47 ±0.18d*	1.03 ±0.04c
	AM + EAEC	0.03 ± 0.0a*	0.27 ±0.07a*	0.10 ±0.01a*	0.08 ±0.02a*	0.13 ±0.13a*	0.09 ±0.01a*
	AM + EAHEC	0.09 ±0.01a*	0.12 ±0.08a*	0.19 ±0.01a*	0.04 ±0.01a*	0.11 ±0.02a*	0.14 ±0.01a*
<i>Glut</i>	Solo AM		0.75 ±0.02c	1.14 ±0.07c	0.83 ±0.08c	1.03 ±0.06c	0.6 ±0.09b*
	E/C + EAEC	1.73 ±0.01d*	0.35 ±0.01a*	0.30 ±0.12a*	0.47 ±0.04b*	0.53 ±0.03b*	0.01 ± 0.0a*
	E/C + EAHEC	0.44 ±0.01b*	0.26±0.02a*	0.50 ±0.01b*	0.36 ±0.01a*	0.34 ±0.06a*	0.43 ±0.09b*

Antimicrobianos (AM), superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx). EAEC: *E. coli* 042, EAHEC: *E. coli* O104: H4 ±: Desviación estándar. Diferentes letras indican una expresión en número de veces que difiere del control, analizando las categorías con bacterias, AM o con AM más bacterias individualmente. El grupo control se normalizó con el valor 1, (subconjunto poblacional c), indicando los valores >1 sobre-expresión y < 1 represión de los genes evaluados. (\*) Significancia estadística (P≤0.05).

### 9.6. Obtención de mutantes híbridas.

Debido a las variaciones obtenidas en el patrón de adhesión EHAEC O104:H4, en presencia de carvacrol, se consideró que este producto podía tener un efecto directo sobre proteínas que definen la estructura en forma de ladrillos apilados, siendo esta la razón para iniciar la obtención de mutantes *Δaap* y *ΔaggA*, a fin de poder proponer un posible mecanismo de acción.

Se utilizó la técnica de recombinación homóloga, donde construimos primeramente el plásmido pKD46 con resistencia a espectinomicina (pKD46<sup>Espect r</sup>) insertando una secuencia de 1475 pb después de linearizar el plásmido con la enzima EcoRV. El producto ligado se incorporó a *E. coli* DH5α por electrocompetencia. El plásmido pKD46 con resistencia a espectinomicina (pKD46<sup>Espect r</sup>) se utilizó para transformar a EHAEC O104:H4, obteniendo 23 UFC lo que se reportó como una eficiencia de transformación de 68 UFC/μl de plásmido. El fragmento amplificado por PCR que codifica para

resistencia a kanamicina y posee los sitios de reconocimiento para el gen blanco, fue introducido en un segundo evento de electrocompetencia en EHAEC O104:H4 resistente a espectinomicina (pKD46 Espect<sup>r</sup>).

Las UFC transformadas fueron seleccionadas en agar Luria Bertani adicionado con espectinomicina y kanamicina, obteniendo una eficiencia de transformación de 16 UFC/ $\mu$ l de producto amplificado. Posterior al flaqueo por PCR del gen *aap*, obtuvimos 3 clonas que tuvieron bandas entre 1500 y 600 pb, esta última representaba la inserción de la secuencia de kanamicina en el plásmido pAA para deletar el gen *aap* respondiendo a la corroboración de la mutación. Lamentablemente al obtener más de una banda (Fig 20), consideramos a estas cepas como posibles mutantes híbridas, muy probablemente debido que la ubicación del gen *aap* en un plásmido limite la delección de todos los genes al mismo tiempo, si tenemos en cuenta que generalmente se presentan con más de una copia genómica. La realización de la técnica para la obtención de *ΔaggA* quedó pendiente de evaluación porque de igual modo que *aap*; *aggA* se ubica en el plásmido pAA.

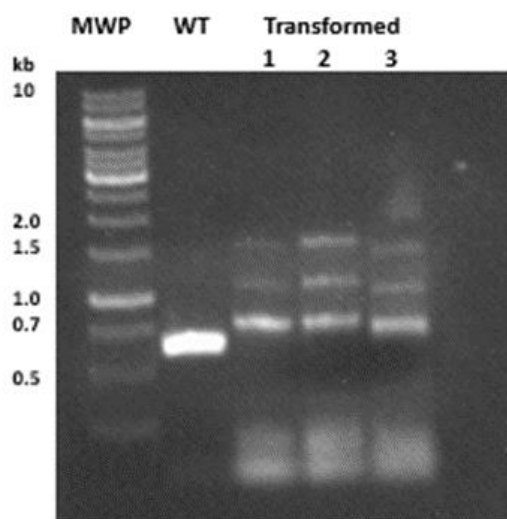


Figura 20 Electroforesis mostrando clonas híbridas post-recombinación homóloga en gel de agarosa al 1.0 %.

MWP: marcadores de peso molecular; WT (EHAEC O104:H4, silvestre) y transformadas 1, 2 y 3 donde se observan diferentes bandas sugiriendo hibridez en la mutación.

## 10. DISCUSIÓN

La capacidad de las cepas enterogregativas para adherirse en 3h a células eucarióticas HEp-2 produciendo un patrón en forma de ladrillos apilados, nos permitió estudiar el efecto de antimicrobianos en el proceso de adhesión, para poder predecir sitios de acción para estos compuestos, considerando que actuaban solo en la bacteria, en la célula eucariótica o en ambas. Desde que iniciamos la determinación de las CMB encontramos que los antimicrobianos, tenían efectos bactericidas contra las cepas estudiadas, encontrando que los valores más altos de CMB correspondieron a los extractos crudos de orégano y Hb, siendo a su vez los que mostraron mayor variabilidad entre las cepas. En contraste, la rifaximina y el carvacrol a dosis muy bajas fueron muy activas para inhibir el crecimiento de las cepas, probablemente porque los compuestos estaban puros (Kim, Cornell, & Preston, 1995), aunque la brasilina era un compuesto puro y necesitó concentraciones relativamente altas para inhibir el crecimiento bacteriano.

Cuando establecimos la concentraciones sub-CMB que se utilizaron durante esta investigación, se determinó que no afectaran la viabilidad, ni la integridad de la membrana bacteriana; la rifaximina que ejerce su actividad antibacteriana al unirse a la RNA-polimerasa impidiendo la síntesis del ADN (Jiang & Dupont, 2005), resultó ser el compuesto más activo contra las cepas estudiadas. El carvacrol que es el compuesto mayoritario del extracto de orégano, ha sido referenciado tener actividad antimicrobiana actuando principalmente en la membrana citoplasmática las bacterias, reconociéndose a las proteínas asociadas a membrana, como sus posibles objetivos, (Juven *et al.*, 1994). Alteraciones estructurales y funcionales en la membrana, la interferencia en la síntesis y la funcionalidad de los ácidos nucleicos, la coagulación del citoplasma provocando la fuga de sus constituyentes y el desequilibrio del metabolismo con la consiguiente interrupción de la comunicación bacteriana a través de la inhibición de quórum sensing (QS) son tan solo algunos de los daños reportados para este compuesto contra los microorganismos (Marinelli, Di, & Ivana, 2018).

El extracto de orégano, también ha mostrado actividad sobre la membrana, sin embargo este extracto está compuesto por varios principios activos, por lo que se mecanismo de acción es más amplio y menos específico (Özkalp *et al.*, 2015), sin embargo se necesitó mayor dosis que en el carvacrol. Por otro lado, la brasilina la cual presenta como principio activo la saponinas (homoisoflavonoide), solo se conoce que son metabolitos secundarios involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de hongos, bacterias, levaduras y algunos insectos. Estos mecanismos de inhibición no está del todo entendidos, existiendo poca información acerca del efecto de las saponinas en los polisacáridos de la pared celular y los fosfolípidos de la membrana celular de las bacterias.

Por otra parte, mantener las células HEp-2 viables en presencia de los antimicrobianos a las concentraciones seleccionadas era imprescindible. El carvacrol a 0.025 mg/ml resultó ser tóxico para las células HEp-2, por lo que no se pudo utilizar en el ensayo donde se preincubaban estas células con los extractos. Se ha reportado que el carvacrol en concentración de 200 y 400 mg/l provocó disminución de la tasa de proliferación en células de neuroblastoma N2a (Aydin *et al.*, 2014).

En general los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión evidenciaron que 3 (rifaximina, carvacrol y extracto de orégano) de los 5 compuestos evaluados inhibieron la capacidad de las cepas de *E. coli* para adherirse a la superficie celular, independientemente del tipo de adhesión manifestada (AA; AL). El extracto de orégano y el carvacrol redujeron significativamente el número de bacterias adheridas cuando se agregaron tanto a bacterias como a las células HEp-2. Como era de esperar, la reducción del tiempo de contacto de la bacteria con los antimicrobianos (de 4 a 1 h), mostró menor inhibición de la adhesión, por lo que su presencia en la fase inicial de la adhesión provocó mayor respuesta inhibitoria. Es relevante comentar que la rifaximina también redujo significativamente las bacterias adheridas.

Taylor y colaboradores (2011) habían establecido que compuestos naturales como el timol y el carvacrol a concentraciones sub-CMB reducen significativamente la adhesividad de *E. coli* a células vaginales, así como la invasión de *Salmonella* a IPEC-J2 (células epiteliales intestinales porcinas), respectivamente; lo cual fue acorde con los resultados encontrados en este trabajo. Es importante destacar que ambos compuestos (timol y carvacrol) están presentes en el aceite esencial de orégano (Inamuco *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos por la adición de brasilina y Hb como promotores de la adhesión puede tener una causa probable en la actividad que tiene este compuesto para inhibir la telomerasa; se ha demostrado que tiene potencial anticancerígeno y si tenemos en cuenta el origen de HEp-2 muy probablemente sea una de las causas que facilitó el aumento de la adhesión en presencia de estos compuestos (Zanin *et al.*, 2012)

La exposición de las células HEp-2 a concentraciones sub-CMB de antimicrobianos por 1 h, no mostró variaciones en el número de bacterias adheridas a estas células, evidenciando que la interacción de estos compuestos con células HEp-2, no son la causa de la inhibición de la adhesión de *E. coli*-HEp-2. En contraste, Brown y colaboradores (2010) realizaron un ensayo similar donde pre-expusieron a las células HEp-2 a 64 µg/ml de rifaximina y después de 24 h retiraron el medio e infectaron con EAEC por 3 h, en este caso, a diferencia de nuestro trabajo observaron reducción del número de bacteria adheridas,



y la causa de esta diferencia puede ser la elevada concentración de rifaximina utilizada y el tiempo de exposición de las células a los antimicrobianos.

De igual modo, aunque la aplicación de los compuestos después de que ocurrió la unión *E. coli*-HEp-2, no fue efectivo para lograr la separación bacteria-célula, nos permitió corroborar que era imprescindible la pre-incubación de la bacteria con los antimicrobianos si se quiere obtener una respuesta inhibitoria eficaz; porque durante tres h con tiempos de generación de 20 minutos, *E. coli* es capaz de iniciar en múltiples ocasiones nuevas fases de adhesión, que en presencia de los compuestos estaría inhibida, sin embargo, esa no fue la respuesta que se obtuvo, ya que esta capacidad para inhibir la adhesión se fue perdiendo conforme al tiempo.

Quedando demostrado que los antimicrobianos afectaron mecanismos fisiológicos de las bacterias que inhiben su adhesión a células eucarióticas, se procedió a analizar si estos cambios podían ser inducidos a nivel de expresión génica. Aunque no pudimos establecer a alguno de los genes estudiados como uno de los responsables del efecto anti-adhesión observado, se detectaron algunas variaciones importantes en todos los genes estudiados relacionados con la adhesión.

El proceso de adherencia en EAEC requiere estructuras fimbriales llamadas fimbrias de adherencia agregativa (AAF) codificadas por el plásmido pAA, *aggR* es un regulador maestro que controla la expresión de genes plasmídicos y cromosómicos y regula la AAF y la expresión de *aap* (Monteiro *et al.*, 2009). En este estudio, demostramos que lograr el entendimiento de una respuesta fenotípica requiere un trabajo molecular que combine muchos elementos, aunque es cierto que no obtuvimos resultados contundentes con los análisis de expresión de genes, es importante tener en cuenta que en todos los casos muestreados en al menos uno de los tres genes *aggR*, *aggA* y *pic* investigados como posibles facilitadores de adhesión en EAEC, estuvieron reprimidos por efecto de los antimicrobianos.

Sin embargo, si analizamos el comportamiento de la expresión del gen *aap*, podemos suponer que la respuesta inhibitoria puede ser dada por la acción de los antimicrobianos sobre la membrana, ya que *aap* codifica para la dispersina, proteína responsable de mediar un fenotipo antiagregación, induciendo cambios en la polarización de la membrana externa de la célula bacteriana, interrumpiendo la atracción electrostática de la fimbria de adherencia agregativa FAA (Kaur *et. al*, 2010), en nuestro trabajo los antimicrobianos reprimieron la expresión de este gen; permitiéndonos explicar por qué las bacterias, incluso cuando mostraron inhibición de la adhesión, mantuvieron tendencias a agregarse

cuando fueron tratadas con rifaximina y extracto de orégano. Fue muy interesante observar un marcado efecto antiagregante en aquellos tratados con carvacrol donde los adheridos se mantuvieron separados, la base de este efecto podría explicarse con base a que este compuesto favorece la carga negativa de la membrana o a que contribuye a preservar la estabilidad estructural de la dispersina en su enlace disulfuro y núcleo hidrofóbico. La dispersina comprende dos láminas B en una configuración alargada con dos pequeñas hélices a en cada polo, lo que le da estabilidad en el ambiente hostil del intestino (Sheikh *et al.*, 2002).

Es importante mencionar, además, que el tamaño de la proteína principal de la fimbria de adherencia agregativa difiere entre los serotipos de EAEC 042 y EHAEC O104:H4 por lo que puede haber variaciones importantes que provocaran diferencias en el patrón en forma de ladrillos apilados característico que fue afectado mayormente en el serotipo híbrido. El gen *aggA* que codifica para la proteína en cuestión presenta en EAEC 042 (Número de acceso: GenBank: AB571092.1:34-516) 483 pb formando una proteína de 160 aminoácidos, mientras que en EHAEC O104:H4 (Número de acceso: GenBank: AFOB02000132.1) con 351pb tiene 116 aminoácidos (NCBI, Maryland, EUA), sugiriendo que tal vez estas diferencias unidas al déficit de dispersina pueden favorecer variaciones en la expresión fenotípica independientemente de la inhibición de la adhesión como se observó en EAHEC.

Por otro lado, la expresión ligeramente incrementada del fago de *stx2a* en las bacterias no adheridas del serotipo O104:H4 resultó interesante, porque es conocido que el papel de los antibióticos en el tratamiento de las infecciones por *E. coli* productoras de toxinas shiga (STEC) es contradictorio debido a la preocupación por desencadenar el síndrome hemolítico-urémico (SUH) al aumentar la producción de toxina Shiga (Stx) durante el tratamiento. En contraste a lo obtenido, Bielaszewska y colaboradores (2012) quienes encontraron que no se indujeron fagos que albergaran *stx2* ni aumentó la transcripción o producción de *stx2* en investigaciones realizadas donde trataron *E. coli* O104:H4 con rifaximina, sin embargo, Nassar y colaboradores (2013) determinaron utilizando concentraciones sub-CMB de rifampicina (grupo farmacológico de la rifaximina) un aumento en la producción de Stx2 de manera independiente a la respuesta SOS en *E. coli* O157:H7, evidenciándose que las dosis sub-CMB determinan el resultado obtenido.

De igual modo, la subexpresión de este gen en presencia de carvacrol, está acorde a lo investigado por Mith y colaboradores (2014) en su estudio *E. coli* O157: H7, mostrando la misma tendencia a partir de tratamientos con este compuesto, pero a diferencia nuestra, ellos investigaron la *stx2b*, debido a sus

resultados sugirieron el carvacrol como potente mitigador de efectos adversos para la salud causados por la expresión del genes de virulencia de EHEC O157: H7, vale mencionar que ellos evaluaron 6 genes. Inesperadamente, el extracto de orégano manifestó aumento en la producción de stx, existiendo pocos reportes al respecto pues se utiliza principalmente aceites esenciales de orégano, no así extracto etanólico.

Poder observar la adhesión de las mutantes de *E. coli*  $\Delta aap$  y  $\Delta aggA$  y compararlas con los obtenidos después de la exposición con antimicrobianos se convirtió en un desafío durante esta investigación no pudiendo completarlo; lo más cerca que estuvimos de lograr la delección del gen *aap*, fue obteniendo mutantes híbridas muy probablemente porque los plásmidos tienen más de un número de copias, por tanto si ocurriese la recombinación de genes en al menos un plásmido sería suficiente para que la cepa se desarrolle en presencia de kanamicina, sin embargo albergando al menos un plásmido con la secuencia original es suficiente para que la actividad del gen persista y como consecuencia la presencia de dispersina. A pesar de los intentos por seleccionar la población, en presencia de antibióticos, todos los ensayos de PCR punto final presentaron más de una banda dentro de los rangos establecidos de amplificación para este ensayo (673/1584 pb; *aap*/resistencia a kanamicina insertada eliminando el gen *aap*). Continuar el desarrollo de las mutantes para establecer patrones de comparación, sería la perspectiva actual más importante de la presente investigación.

## 11. CONCLUSIONES:

- 1) Las concentraciones seleccionadas de antimicrobianos no afectaron la viabilidad ni la integridad de membrana en los 3 serotipos de *E. coli* estudiados.
- 2) Las células HEp-2 manifestaron  $\geq 90\%$  de viabilidad a 4, 12 y 24 h de exposición a los antimicrobianos, excepto la concentración de 0.025 mg/ml de carvacrol que causó 70% de afectación en la viabilidad.
- 3) La rifaximina, carvacrol y extracto de orégano inhiben la capacidad de adhesión de *E. coli* a células Hep-2.
- 4) La Brasilina y el palo de Brasil (Hb) aumentaron la adhesión de *E. coli* a células HEp-2.
- 5) La rifaximina, carvacrol y extracto de orégano inhibieron la capacidad de adhesión de *E. coli* a células HEp-2, cuando están presentes durante la etapa inicial de la adhesión.
- 5) La rifaximina, carvacrol y extracto de orégano no bloquean las propiedades adhesivas de las células HEp-2.
- 6) El carvacrol en concentración de 10 mg/ml, modificó el patrón de adhesión en el serotipo EAHEC O104:H4.
- 7) Se observaron modificaciones en la expresión génica y el comportamiento adherente de bacterias agregativas no adheridas pero expuestas a los antimicrobianos.
- 8) La rifaximina, carvacrol y extracto de orégano alteraron la actividad genotípica de manera dosis dependiente en las bacterias adheridas, evidenciando una marcada diferencia entre los serotipos agregativos.
- 9) La mayoría de los antimicrobianos afectaron la expresión de genes del estrés oxidativo de las células HEp-2 debido a una posible respuesta de defensa por las células eucarióticas.

## 12.REFERENCIAS.

- Ahmed, S.A., Awosika, J., Baldwin, C., Bishop-Lilly, K.A., Biswas, B., *et al.* (2012) Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. *PLoS ONE*, 7(11), pp.1-22. doi:10.1371/journal.pone.0048228.
- Aydın, E., Turkez, H. & Keles, M.S. (2014). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells : some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66(149), pp. 157149-157. doi.10.1007/s10616-013-9547-5.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Zhang, W., Friedrich, A. W., Mellmann, A., Tscha, H., & Karch, H. (2006). Chromosomal dynamism in progeny of outbreak-related sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp. 1900-1909. doi. 10.1128/AEM.72.3.1900.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. & Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), pp. 671-676. doi. 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
- Bielaszewska, M., Idelevich, E.A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F. & Mellmann (2012). A. effects of antibiotics on shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104 : H4 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), pp. 3277-3282.
- Biliński, P., Kapka-skrzypczak, L., & Posobkiewicz, M. (2012). Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E . coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1), pp. 3-10.
- Blanco, J. (2012). *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de stx2a. . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), pp. 84-89. doi.10.1016/j.eimc.2011.09.008.
- Brown, E. L., Xue, Q., Jiang, Z., Xu, Y., & Dupont, H. L. (2010). Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), pp. 388-396. doi.10.1128/AAC.00691-09.
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Ju, F. M., Gottschalk, G., &

- Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype : Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* ( EAHEC ). *Microbiology*, 193, pp. 883-891. doi.10.1007/s00203-011-0725-6.
- Burt, S.A., Zee, R., Van Der Zee, R., Koets, A.P., Graaff, A.M., Knapen, F.V., Gaastra, W., Haagsman, P. & Veldhuizen, E.J.A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), pp. 4484-4490. doi.10.1128/AEM.00340-07.
- Cahill, S.M., Desmarchelier, P., Fattori, V., Bruno, A., & Cannavan, A. (2017). Global perspectives on antimicrobial resistance in the food chain. *Food Protection Trends*, 37(5), 353–360.
- Callaway, T.R., Elder, R.O., Keen, J.E., Anderson, R.C., & Nisbet, D.J. (2010). Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(3), pp. 852-860. doi.10.3168/jds.s0022-0302(03)73668-6.
- Casey, P.G., Hill, C. & Gahan, C.G. (2011). Social media and the characterization of an emerging pathogen. *Bioengineered Bugs*, 2(4), pp. 189-193. doi. 10.4161/bbug.2.4.16961.
- Chattaway, M.A., Dallman, T., Okeke, I.N. & Wain, J. (2011). Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again?. *Infection in Developing Countries*, 5:425-436. doi: 10.3855/jidc.2166.
- Chekabab, S.M., Paquin, J., Dozois, C.M., Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiology Letters*, 341(1), pp. 1-12. doi.org/10.1111/1574-6968.12078
- Chowdhury, P.R., Charles, I.G. & Djordjevic, S.P. (2015). A role for Tn6029 in the evolution of the complex antibiotic resistance gene loci in genomic island 3 in enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS ONE*, 10(2): 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0115781.
- Collins, F.M., Morrison, N.E., Dhople, A.M. & Watson, S.R. (1980) Microscopic counts carried out on *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* suspensions. A comparison of three staining procedures. *Leprosy*, 48(4), 402-415.
- Cravioto, R.J. Gross, S.M. & Scotland, B.R. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, 3, pp. 95–99.

- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6640-6645. doi. 10.1073/pnas.120163297.
- Dogan, B., Fu, J., Zhang, S., Scherl, E.J., & Simpson, K.W. (2018). Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *The Journal of Antibiotics*, 71, pp. 485-494. doi.10.1038/s41429-017-0022-y.
- Dupont, H.L. (2016). The antimicrobial effects of rifaximin on the gut microbiota. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(1), pp. 3-10. doi.10.1111/apt.13434.
- Farfán, A.E., Ariza, S.C., Vargas, F.A. & Vargas, L.V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33 (4), pp. 438-450
- Fedorchuk, C., Kudva, I.T. & Kariyawasam, S. (2019) The *Escherichia coli* O157:H7 carbon starvation-inducible lipoprotein Slp contributes to initial adherence *in vitro* via the human polymeric immunoglobulin receptor. *PLoS ONE* 14(6), pp. 1-18. doi.10.1371/journal.pone.0216791
- Fillebeen, C. & Pantopoulos, K. (2013) Hepatitis C virus infection causes iron deficiency in Huh7.5.1 cells. *PLoS ONE* 8(12), e83307. doi. 10.1371/journal.pone.0083307
- Frank, C., Werber D., Cramer J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M.D., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M., Follin, P., Müller, L. King, L., Rosner, B., Buchholz, U. & Stark, K., (2011). Epidemic profile of shiga-toxin-producing. *The New England Journal of Medicine*, 365 (19), pp. 1771-1780. doi: 10.1056/NEJMoa1106483.
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 59, pp. 124–132. doi:10.1016/j.fm.2016.06.001
- Grad, Y.H., Godfrey, P., Cerquiera, G.C., Mariani, P., Gouali, M., Bingen, E., Shea, T.P., Haas, B.T., Griggs, A., Young, S., Zeng, Q., Lipsitch, M., Waldor, M.K., Weill, F.X., Wortman, J.R. & Hanage J.P. (2013). Comparative genomics of recent shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: Short-term evolution of an emerging. *mBio* 4(1), pp. 1-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00452-12>.
- Haack, K. R., Robinson, C. L., Miller, K. J., Fowlkes, J. W., & Mellies, J. L. (2003). Interaction of Ler at the LEE5 (tir) Operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 71(1), 384–

- Haimes, J., & Kelley, M. (2010). Demonstration of a  $\Delta\Delta C q$  calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. *Group: Horizon Discovery*, 3, pp. 6-18. Available in: <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Technical-manuals/delta-cq-solaris-technote.pdf>
- Harrington, S.M., Strauman, M.C., Abe, C.M., & Nataro, J.P. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 7(11), pp. 1565-1578. doi.10.1111/j.1462-5822.2005.00588.x
- Heredia, N., Escobar, M., & Rodríguez, C. & García, S. (2005). Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Protection*, 68(7), pp. 1346–1351. doi.10.4315/0362-028X-68.7.1346.
- Inamuco, J., Veenendaal, A.K.J., Burt, S.A., Post, J.A., Bokhoven, J.L., Haagsman, H.P., & Veldhuizen, E.J. (2012). Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella* Typhimurium motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 157(1–2), pp. 200-207. doi.10.1016/j.vetmic.2011.12.021.
- Invitrogen., Thermo Scientific., (2004). LIVE / DEAD® BacLight™ Bacterial viability kits protocol. Available in: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7012#/L7012>
- Jensen, B.H., Olsen, K., Struve, C., Krogfelt, K.A., & Petersen, A.M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*, 27(3), pp. 614-630. doi.10.1128/CMR.00112-13.
- Jiang, Z.D., & Dupont, H.L. (2005). Rifaximin : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity. *Chemotherapy*, 51(1), pp. 67-72. doi.10.1159/000081991.
- Johnson, J.R., & Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Infectious Diseases*, 181(1), pp. 261–272. doi.10.1086/315217.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Applied Bacteriology*, 76(6), pp. 626-31. doi.10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x.



- Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B.B., Hengge, R., Johannes, L. & Vicente, M. (2012). The enemy within us : lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Molecular Medicine*, 4, pp. 1-8. doi.10.1002/emmm.201201662.
- Kaur, P., Chakraborti, A., & Asea, A. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* : An emerging enteric food borne pathogen. *Infectious Diseases*, pp.1-9. doi.10.1155/2010/254159.
- Kim, J.M., Cornell, J.A., & Preston, J.F. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella* Typhimurium in culture medium and on fish cubes. *Food Science*, 60(6), pp. 1364. doi.10.1111/j.1365-2621.1995.tb04592.x.
- Kimmitt, P.T., Harwood, C.R., & Barer, M.R. (2000). Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli* : the role of antibiotics and the bacterial S.O.S. response. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 458-465. doi.10.3201/eid0605.000503.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., & McNeish, A.S. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 57(4), pp. 1290-1298.
- Louise, C.B. & Obrig, T.G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 - derived shiga-like toxin 2 with human renal endothelial cells. *Infectious diseases*, 172(5), pp. 139-401. doi:0.1093/infdis/172.5.1397. pp. 1397-1401.
- Lozano, S.A., Bautista, E., Merino, J.A., Varela, M., Muñoz, L.E., Cordero, P., Martinez, M., L. & Rivas A.M. (2016). S-adenosyl-L-methionine modifies antioxidant-enzymes, glutathione-biosynthesis and methionine adenosyltransferases-1/2 in hepatitis C virus-expressing cells. *Gastroenterology*, 22(14): 3746-3757. doi. 10.3748/wjg.v22.i14.3746.
- Marinelli, L., Di, A., & Ivana, S. (2018). Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochemistry*, 17(4), 885-903. doi.10.1007/s11101-018-9569-x.
- McWilliams, B.D. & Torres, A.G. (2015). EHEC adhesins. *Microbiology Spectrum*, 2(2), pp. 1-19. doi.10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013.EHEC.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., & Karch, H. (2009). Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology*, 136(6), pp. 1925-1938. doi.10.1053/j.gastro.2008.12.072.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico & A., Karch, H. (2011). Prospective genomic characterization of the german enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4

outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE*, 6(7). doi.10.1371/journal.pone.0022751.

Menne, J., Nitschke, M., Stingele, R., Abu-Tair, M., Beneke, J., Bramstedt, J. & Kuehbacher, T. (2012). Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: Case-control study. *BioMed (BMJ)*, 345(7869), pp. 1-13. doi.10.1136/bmj.e4565.

Mith, H., Clinquart, A., Zhiri, A., Daube, G. (2014). The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157 : H7. *FEMS Microbiology Letters*, 365(1),pp. 1-7. doi.10.1093/femsle/fnu021.

Mohamed, J.A., Huang, D.B., Jiang, Z., Dupont, H.L., Nataro, J P., Belkind-gerson, J., & Okhuysen, P. C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Clinical Microbiology*. 45(1), pp. 121-126. doi.10.1128/JCM.01128-06.

Monteiro, B.T., Campos, L.C., Sircili, M.P., Franzolin, M.R., Bevilacqua, L.F., Nataro, J.P. & Elias, W.P. (2009). The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 65, pp. 81-84. doi. 10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.011

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunological Methods* 65 (1-2), pp. 55–63. doi. 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Müller, W. (2008). Biochemistry, foundations for medicine and life sciences. Available in: <http://www.sinapsisprojects.com/medicwebcast/9788429173932.pdf>

Munder, M.C., Midtvedt, D., Franzmann, T., Richter, D., Guck, J., Zaburdaev, V. & Alberti, S. (2016). A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid to a solid-like state promotes entry into dormancy. *Cell Biology*. 5, pp. 1-30. doi.10.7554/eLife.09347.

Munera, D., Ritchie, J.M., Hatzios, S.K., Bronson, R., Schadt, E.E., Davis, B.M. & Waldor, M.K. (2014). Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nature Communications*. doi.10.1038/ncomms4080.

Nassar, F.J.,Rahal, E.A.,Sabra, A. & Matar, G.M. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of

- antimicrobial agents on *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxin release and role of the SOS response. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(9), pp. 805-812. doi. 10.1089/fpd.2013.1510
- Nataro, J.P. (2005). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Current Opinion Gastroenterology*, 21(1), pp. 4-8.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology*, 11(1), pp. 142–201.
- Navarro-Garcia, F. (2015). *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/shiga toxin-producing, an explosive cocktail of high virulence. *Microbiology Spectrum*, 2(6), pp. 1-19. doi.10.1128/microbiolspec.ehec-0008-2013.
- Nunes, I.F., Boisen, N., Da Silva, J., Havt, A., De Carvalho E., Melo A., Leal, Salani, R.M., Nataro, J.P., Guerrant L. & Moreira, A.A., (2013). Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp. 683–693. doi:10.1099/jmm.0.054262-0.
- Obrig, T. G., Louisesb, C. B., Lingwoodq, C. A., Barley-maloney, L., & Daniel, T. (1993). Endothelial heterogeneity in shiga toxin receptors and responses. *Biological Chemistry*. 268(21), pp. 15484-15488.
- Olivares, E., Badel, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2017). Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 1-9. doi.10.3389/fmicb.2017.01289.
- Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M., & Özcan, M. M. (2015). The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) *Food, Agriculture & Environment* 8(2), pp. 272-274.
- Piérard, D., Greve, H. De, Haesebrouck, F., & Mainil, J. (2012). O157:H7 and O104:H4 Vero / Shiga toxin- producing *Escherichia coli* outbreaks : respective role of cattle and humans. *Veterinary Research*, 43(1), pp. 13-22. doi: 10.1186/1297-9716-43-13.
- Rabin. G., & Salam, A.I. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, pp. 412-429. doi.10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
- Richardson, S.E., Mohamed, A., Laurence, E., & Charles, R. (1998). The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Human Pathology*, 19(9), pp. 1102-1108. doi.10.1016/S0046-8177(88)80093-5.

- Robert Koch-Institut. (2011). EAHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011. Available in: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC\\_O104/EHEC\\_O104\\_Ausbruch\\_2011.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC_O104/EHEC_O104_Ausbruch_2011.html)
- Rohde, H., Qin, J., Cui, Y., Li, D., Loman, N.J., Hentschke, M., Zhao, M., Wang, P., Guan, Y., Cen, Z., Zhao, X. & Christner, M. (2011). Open-source genomic analysis of shiga-toxin–producing. *The New England Journal of Medicine*. 365(8), 718-724. doi. 10.1056/NEJMoa1107643.
- Ross, B.N., Rojas, M., & Cieza, R.J. (2015). The role of long polar fimbriae in *Escherichia coli* O104:H4. Adhesion and colonization. *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1-17. doi.10.1371/journal.pone.0141845.
- Safadi, R. Al, Abu-ali, G.S., Sloup, R.E., Rudrik, J.T., Waters, C.M., Eaton, K.A., & Manning, S.D. (2012). Correlation between *in vivo* biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS ONE*, 7(7). doi.10.1371/journal.pone.0041628.
- Sandvig, K. & Deurs, B.V. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Cell and Developmental Biology*, 18(24), pp. 1-24. doi.10.1146/annurev.cellbio.18.011502.142107.
- Scheutz, F., Nielsen, E. M., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J. P., & Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enteroaggregative shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance* 16(24), pp. 19889. doi.10.2807/ese.16.24.19889-en.
- Sheikh, J., Phillips, A., Nataro, J. P., , Czeczulin, J. R., Harrington, S. & Phillips, A. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli* find the latest version. *Clinical Investigation*, 110(9), pp. 1329-1337. doi.10.1172/JCI200216172.
- Soon, J.M., Seaman, P., & Baines, R.N. (2012). *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Hygiene and Environmental Health*, 216(3), pp. 346-354. doi.10.1016/j.ijheh.2012.07.005.
- Stratakis, A.C., Sima, F., Ward, P., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L. & Corcionivoschi, N. (2017). The *in vitro* effect of carvacrol, a food additive, on the pathogenicity of O157 and non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Food Control*. doi.10.1016/j.foodcont.2017.08.014.
- Taylor, P., Sasso, M.D., Culici, M., Braga, P.C., Guffanti, E.E., Mucci, M. & Braga, P.C. (2011). Thymol : Inhibitory activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* adhesion to human vaginal cells. *Essential Oil Research*, 18(4), pp. 455-461. doi.10.1080/10412905.2006.9699140.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., *et al.* (2009) Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*,

5(1), pp. 1-25. doi:10.1371/journal.pgen.1000344.

Vidal, J.E. (2014). Pathogenic bacteria and humans: The importance of bacterial virulence. (2003). Available in: [https://www.researchgate.net/publication/257927195\\_Bacterias\\_patogenas](https://www.researchgate.net/publication/257927195_Bacterias_patogenas).

Wadl, M., Rieck, T., Nachtnebel, M., Greutelaers, B., Heiden, D., Altmann, D., Hellenbrand W., Faber, M., Frank, C., Schweickert, B., Krause, G., Benzler, J. & Eckmanns T., (2011). Enhanced surveillance during a large outbreak of bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin / verotoxin-producing *Escherichia coli* in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance*, 16(24), pp. 19893. doi. 10.2807/ese.16.24.19893-en.

Wu, C.J., Hsueh, P.R., & Ko, W.C. (2011). A new health threat in Europe: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 infections. *Microbiology, Immunology and Infection*, 44(5), pp. 390-393. doi.10.1016/j.jmii.2011.07.001.

Zanin, J.L.B., Carvalho, B.A., De Martineli, P.S., Henrique, M., Lago, J.H.G., Sartorelli, P. & Soares, M.G. (2012). The genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpinaceae*): phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, 12, pp. 7887–7902. doi.10.3390/molecules17077887.

CVU: 745765